Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität
- Direktor: Prof. Dr. H. Herken -

Synthese von Cholinesterase im Zentralnervensystem der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

1962

vorgelegt von
Arno Brunnemann
aus Celle

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 61, App. 668

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität
- Direktor: Prof. Dr. H. Herken -

Synthese von Cholinesterase im Zentralnervensystem der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Arno Brunnemann
aus Celle

1. Referent: Prof. Dr. H. Herken
2. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1962

Tag der Promotion: 19. Dez. 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Experimenteller Teil	7
A. Allgemeine Gesichtspunkte der Versuchsanordnung	7
B. Experimente zum Problem der Reaktivierung durch körpereigene Substanzen	8
C. Methodik der Cholinesterasebestimmung	14
D. Versuche über die Synthese von Cholinesterase nach DFP-Vergiftung:	16
1) Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im Gehirn, Zwerchfell und M. gastrocnemius von Ratten verschiedenen Alters	16
2) Toxicität von DFP	17
3) Synthesegeschwindigkeit der Cholinesterase nach der DFP-Vergiftung bei jungen und alten Ratten	18
4) Berechnung der mittleren Dauer der Hemmung und der Halbwertzeit des Fermentes als Maß für die Synthesegeschwindigkeit	19
5) Einfluß der Substratkonzentration oder der Konzentration der Spaltprodukte auf die Synthese der Acetylcholinesterase. Versuch mit Eserin	23
E. Versuche über die Beeinflussung der Synthesegeschwindigkeit der Cholinesterase nach der DFP-Vergiftung	25
1) Ernährungsfaktoren	25
a) Nahrungsentzug	25
b) Verfütterung von Hafer, Zucker oder Fleisch	27
2) Unterbinden der Carotiden	28
3) Hormonelle Faktoren und Vitamine	29
a) STH und Vitamin B_{12}	29
b) Thyreoidektomie	32
c) Thyreostatika	36

Seite

d) Schilddrüsenhormon 38

e) Adrenalektomie 39

f) DOCA 42

g) ACTH 46

h) Testosteron 49

i) Insulin 5o

4) CFT 12ol 52

5) Einfluß des Funktionszustandes des Zentralnervensystems. Applikation erregender Substanzen. 54

a) Pervitin 54

b) Kampfer 57

c) Cardiazol und Coffein 59

III. Diskussion 66

IV. Zusammenfassung 77

V. Literaturverzeichnis 79

I. Einleitung

Die Erforschung des Proteinstoffwechsels im Zentralnervensystem ist erst vor wenigen Jahren begonnen worden. Die grundlegenden Arbeiten über die Synthese von Eiweißen wurden zunächst mit Mikroorganismen und später auch mit Lebergewebe durchgeführt. Aus einer 1961 erschienenen Arbeit von Acs, Neidle und Waelsch (1) wissen wir jedoch, daß aus Meerschweinchengehirn gewonnene Ribosomen Aminosäuren genau so schnell einbauen wie Lebermikrosomen. Das Gehirn enthält demnach Zellen, in denen der Eiweißumsatz ungefähr so intensiv ist, wie in der Leber. Aber welchen regulatorischen Einflüssen die Synthese und der Abbau von Protein und insbesondere von Enzymen ausgesetzt sind, ist bisher nur wenig untersucht. Unsere geringen Kenntnisse stützen sich auch hier wieder vorwiegend auf Experimente an Mikroorganismen, die später noch zu diskutieren sind. Jedoch wären gerade am Nervensystem nachhaltige pharmakologische Wirkungen denkbar, die auf einer Änderung des Protein- und E zymstoffwechsels beruhen. Die gezielte pharmakologische Steuerung des Umsatzes ganz bestimmter Enzyme ist ein neuartiges Prinzip der Arzneimittelwirkung, das bei der Anwendung von Dicumarolderivaten zur Thromboseprophylaxe bereits verwirklicht ist und unbestreitbare Erfolge zu verzeichnen hat. Bei den Hormonen des Hypophysenvorderlappens ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, ob sie die Synthese von Enzymen ihrer endocrinen Erfolgsorgane anregen, oder nur ihre Aktivität erhöhen.

Einzig für das Wachstumshormon ist bisher wohl eine Steigerung der Proteinsynthese nachgewiesen. Aber der Mechanismus ist noch völlig ungeklärt. Auf welche Weise Prolactin die Milchproduktion steigert, ist ebenfalls unbekannt. Dagegen dürfte die Wirkung des Thyreotropins wenigstens teilweise als Folge erhöhter Produktion von Thyreoglobulin anzusehen sein.

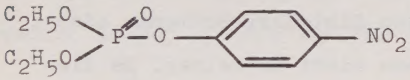
In der vorliegenden Arbeit wurden erste Anhaltspunkte für die Beeinflussung der Synthese von Acetylcholinesterase im Gehirn von Ratten gesammelt. An diesem Ferment sind wir besonders deshalb interessiert, weil es für die Funktion des Nervensystems von ausschlaggebender Bedeutung ist und seine Ausschaltung zum Tode führt.

Das physiologische Substrat dieses Enzyms ist das in den cholinergen Synapsen als Überträgerstoff fungierende Acetylcholin, das nach der folgenden Gleichung zu den unwirksamen Produkten Cholin und Essigsäure gespalten wird:

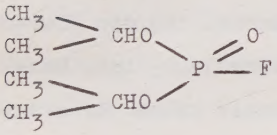
$$\text{Acetylcholin} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholinesterase}} \text{Cholin} + \text{Essigsäure}$$

Acetylcholinesterase kann durch eine Reihe verschiedenartiger Alkylphosphate (einige Formeln S. 3) irreversibel gehemmt werden. Der Mechanismus dieser Hemmung beruht auf einer Phosphorylierung der funktionellen Gruppen des Enzyms (2). In vitro kann die Phosphorylierung weder durch Verdünnen noch durch Dialyse merklich aufgehoben werden (3). Infolgedessen bleibt die erzielte Hemmung praktisch unbegrenzt bestehen. Im lebenden Organismus kommt es jedoch zu einem deutlichen Wiederanstieg der Fermentaktivität. Dieser

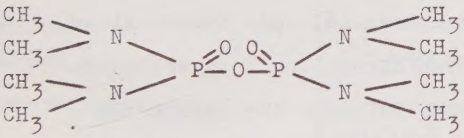
kann bei manchen, nämlich den diaethylsubstituierten Phosphaten in den ersten Stunden durch Dephosphorylierung bedingt sein. Sonst aber läßt sich die Restitution, die 8 bis lo Wochen beansprucht, am ehesten durch Enzymneubildung erklären (4). Der Anstieg der Enzymaktivität gestattet somit die Berechnung der Geschwindigkeit mit der das Ferment gebildet wird. Aus diesem Grunde wurden Alkylphosphate für das Studium des Umsatzes von Acetylcholinesterase verwendet.



E 6oo, Mintacol, Paraoxon, O,O-Diäthyl-phosphorsäure-O-p-nitrophenylester



DFP, Di-isopropyl-fluor-phosphat



OMPA, Octa-methyl-pyro-phosphor-amid

Unsere bisherigen Kenntnisse über den Eiweißumsatz im lebenden Organismus wurden vorwiegend mit der Isotopentechnik gewonnen. Das Ausmaß der Markierung von Proteinen nach der Applikation von Aminosäuren, die radioaktive Elemente enthalten, läßt Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit des Eiweißstoffwechsels zu. Derartige Studien wurden sowohl in vitro mit Gewebsbrei, mit einzelnen Zellfraktionen oder mit Bakterienfragmenten, als auch in vivo

durchgeführt. Von den Organen des Warmblüters, denen unser besonderes Interesse gilt, wurde aus verständlichen Gründen vorwiegend die Leber verwendet. Dagegen sind Untersuchungen mit Nervengewebe viel seltener publiziert worden.

Der Eiweißumsatz im Zentralnervensystem ist deswegen schwierig zu beurteilen, weil Glia und Nervenzellen sich bei der Anwendung biochemischer Techniken nur äußerst schwierig trennen lassen. Außerdem besitzt das Zentralnervensystem in der sogenannten Blut-Hirn-Schranke eine Besonderheit, die andere Organe nicht aufweisen. Da die Aminosäuren sich nach intravenöser Applikation im Gehirn nicht anreichern, wurde zunächst angenommen, daß die Blut-Hirn-Schranke für Aminosäuren schwer durchgängig ist. Daraus wurde dann irrtümlich auf einen relativ trägen Eiweißumsatz im Gehirn geschlossen. Die ersten Gegenargumente brachten Hydén (5) und Greenberg (6), die feststellten, daß nach intrathecaler Verabfolgung von S^{35}-markiertem Methionin eine beträchtliche Aufnahme der markierten Substanz in das Protein des Gehirns stattfindet. Auch Waelsch (7) und Lajtha (8), sowie Palladin (9) und ebenso Richter (1o) fanden einen raschen Einbau von intrathecal, intravenös oder intraperitoneal verabfolgten markierten Aminosäuren ins Gehirnprotein. Vor allem zeigte Waelsch (11,12) mit markierter Glutaminsäure und markiertem Lysin, daß zwischen Blut und Gehirn ein reger Austausch von Aminosäuren besteht, obwohl es nicht gelingt, die Konzentration der Aminosäuren im Gehirn durch ein vermehrtes Angebot auf dem Blutwege zu erhöhen.

Waelsch, Lajtha; Fürst und Gerstein (13,14,15) bestimmten mit C^{14}-Lysin den Umsatz von eiweißgebundenem Lysin im Gehirn, in der Leber und im Muskel von Mäusen und Affen. Dabei wurde das Gehirn der Affen getrennt nach verschiedenen Regionen untersucht. Sie fanden, daß eiweißgebundenes Lysin aus der weißen Substanz (Corpus callosum) schneller verschwindet, d.h. mehr umgesetzt wird als in der grauen Substanz. Maurer (16) dagegen fand bei autoradiographischen Untersuchungen an Mäusegehirnen gerade das Gegenteil, nämlich, daß der Eiweißstoffwechsel der Ganglienzellen größer ist als der von Glia und Mark.

In der folgenden Tabelle 1, die aus dem Arbeitskreis von Maurer stammt, ist die Lebensdauer verschiedener Organeiweiße angegeben, die durch Verwendung von S^{35}-Methionin und C^{14}-Tyrosin ermittelt wurde.

Organ	S^{35}-Methionin	C^{14}-Tyrosin
	mittlere Lebensdauer in Tagen	
Leber	4.o	
Skeletmuskulatur	32.o	
Gehirn	12.8	12.o
Herzmuskulatur	11.8	
Milz	3.7	
Nieren	3.o	

Tabelle 1: Mittlere Lebensdauer für Organeiweiß bei der Ratte nach Niklas A., Quincke E., Maurer W. und Neyen H.
(Biochem Z. 33o, 1, 1958)

Da bei dieser Anwendung der Isotopentechnik nur das Gesamteiweiß erfaßt wird, erhält man einen Durchschnittswert, zu dem die verschiedensten Eiweißbestandteile beitragen. Zum Teil sind es Elemente der im Zentralnervensystem sehr variierenden Zellstrukturen und zum anderen gehören sie allen Gruppen von Enzymen an. Mit Recht kann wohl angenommen werden, daß die Umsatzgeschwindigkeiten von Eiweißen, die so verschiedene Funktionen erfüllen, sich erheblich voneinander unterscheiden. Zudem werden möglicherweise auch Vorstufen oder Abbauprodukte erfaßt, die zwar hochmolekular, aber dennoch biologisch unwirksam sein können. Außerdem erfordert die Isotopentechnik einen großen apparativen Aufwand und die Beachtung einer Reihe von Vorsichtsmaßregeln, die die Experimente erschweren und komplizieren.

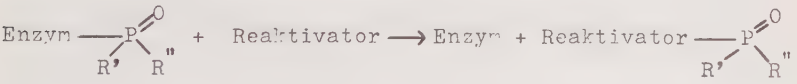
Bei dem hier beschriebenen Verfahren dagegen wird mit einer relativ einfachen Methodik die Synthese eines Fermentes gemessen, das an der Funktion des Nervensystems beteiligt ist. Nachteilig ist, daß die Tiere durch das Alkylphosphat vergiftet werden. Man wird deshalb bei der Interpretation der Ergebnisse und bei der Interpolation auf das gesunde Tier zurückhaltend sein müssen. Dennoch sollte es möglich sein, die unter standartisierten Bedingungen erzielten Resultate vergleichend auszuwerten und auf diese Weise Einflüsse, die die Synthese beschleunigen oder verlangsamen, zu erkennen.

II. Experimenteller Teil

A. Allgemeine Gesichtspunkte der Versuchsanordnung

Als Kriterium der Enzymsynthese dient der Wiederanstieg der Fermentaktivität nach Hemmung mit einem Alkylphosphat. Wie eingangs erwähnt, kann dabei jedoch in der ersten Zeit auch eine Dephosphorylierung durch körpereigene Reaktivatoren eine Rolle spielen (17). Folglich ist es notwendig, diesen Faktor durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen auszuschalten.

Die mit einer Reaktivierung des vergifteten Fermentes einhergehende Dephosphorylierung ist weitgehend von der Art des verwendeten Alkylphosphates abhängig (18). Unsere Informationen über diesen Vorgang stammen aus Untersuchungen mit synthetischen, sogenannten Reaktivatoren, die mit Hilfe nukleophiler Gruppen im Stande sind, den alkylierten Phosphatrest vom Fermentmolekül abzuspalten (19).



Die Geschwindigkeit dieser reaktivierenden Umsetzung wird von der Art der Alkylsubstituenten bestimmt. Mit Äthylgruppen besetztes Phosphat, z.B. im Mintacol, läßt sich leichter abtrennen als das mit Isopropylgruppen substituierte, z.B. im Diisopropylfluorophosphat (DFP). Dimethylaminogruppen verhindern die Dephosphorylierung vollständig. Allerdings sind derartig aufgebaute Verbindungen, wie das Octamethylpyrophosphoramid (OMPA) auch keine direkten

Hemmstoffe der Cholinesterasen. Sie werden erst im Organismus durch N-Oxydation zu den eigentlichen Giftstoffen umgewandelt (2o).

Außerdem ist bekannt, daß die Dephosphorylierung nur während der ersten Stunden oder Tage nach Eintritt der Hemmung möglich ist. Als Ursache dafür wurde anfänglich eine intramolekulare Transphosphorylierung angenommen. Nach neueren Untersuchungen von Jansz, Brons, Warringa (21) und Berends, sowie Posthumus, Sluys und Deierkauf 1959 (22) ist es jedoch wahrscheinlich, daß eine Desalkylierung des am Ferment haftenden Phosphors eintritt, der dann nicht mehr durch Reaktivatoren abgetrennt werden kann. Mit radioaktiv markiertem DFP zeigte sich eine direkte positive Relation zwischen der Abnahme der Reaktivierbarkeit und der Abspaltung eines der beiden Isopropylreste. Nähere Einzelheiten über den Mechanismus dieser Desalkylierung sind bisher nicht bekannt geworden. Wir wissen aber, daß die Reaktivierbarkeit der mit DFP vergifteten Cholinesterase rascher abnimmt als nach der Hemmung mit einem diäthylsubstituierten Phosphat. Das mit DFP gehemmte Enzym läßt sich nach 12 - 18 Stunden nicht mehr reaktivieren, während das mit Mintacol behandelte Ferment noch nach 2 - 3 Tagen partiell reaktiviert werden kann.

B. Experimente zum Problem der Reaktivierung durch körpereigene Substanzen

Auf Grund der angeführten Kenntnisse erschien das DFP für die zu bearbeitende Fragestellung am besten geeignet, weil das Ferment nach der Vergiftung schlecht und auch nur für

kurze Zeit reaktiviert werden kann. Da die Reaktivierung bei der Messung der Neubildung des Enzyms erhebliche Täuschungen hervorrufen könnte, wurde sie in einer Voruntersuchung erneut studiert.

Zunächst sollten in vitro Versuche mit Hirngewebe von vergifteten Tieren klären, ob der Wiederanstieg der Enzymaktivität auch außerhalb des Organismus möglich ist. 15 Minuten nach der s.c. Applikation von 1.5 mg DFP/kg spalteten die Gehirne von 3 Ratten im Mittel 15.1 ± 2 µMol ACh/g x Std., gemessen nach Längsteilung der Hirne und unter Verwendung von je einer Hälfte. Die anderen Hälften dieser Hirne wurden 2o Std., 44 Std. und 68 Std. bei Zimmertemperaturen im offenen Gefäß aufbewahrt, erst dann homogenisiert und ihre Esteraseaktivität gemessen. Durch Austrocknen hatten die Gewichte um 2o % bzw. 42 % und 6o % abgenommen und die Esteraseaktivität war auf 29.6 bzw. 25.4 und 28.6 µMol/g des ursprünglichen Ausgangsgewichtes x Std. gestiegen. (Tabelle 2)

Die Fermentaktivität steigt unter diesen Bedingungen nur innerhalb der ersten 24 Stunden auf fast das Doppelte an. Danach ändert sie sich bis zu 68 Std. nicht mehr. Die Aufbewahrung von Gehirnen unvergifteter Tiere in offenen Gefäßen bei Zimmertemperatur hat, wie Tabelle 3 veranschaulicht, keinerlei Einfluß auf die Esteraseaktivität.

Der Wasserverlust war in diesem Versuch, der mit unversehrten Gehirnen durchgeführt wurde, wesentlich geringer

als in dem in Tabelle 2 aufgeführten, in dem die Hirne in der Mitte durchgeschnitten und deshalb dem Wasserverlust stärker ausgesetzt waren. Da die Versuche an verschiedenen Tagen stattfanden, können sich auch Unterschiede der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit ausgewirkt haben.

Frischgew. des 1/2 Gehirns mg	Esteraseaktivität in µMol/g x Std.				Hirngew. unmittelbar vor der Messung mg (Gewichtsverlust in %)
	sofort	nach 2o Std.	nach 44 Std.	nach 68 Std.	
776	17.3				
694	14.7				
715	13.4				
	15.1 ±2				
725		29.6			58o (-2o%)
827			25.4		478 (-42%)
767				28.6	31o (-6o%)

Tabelle 2: Zunahme der Cholinesteraseaktivität im Gehirn nach dem Töten DFP-vergifteter Tiere (1.5 mg/kg s.c.) und Aufbewahrung des Gewebes in offenen Gefäßen bei Zimmertemperatur. Für jede Bestimmung wurde die Hälfte eines Gehirns verwendet.

In vitro treten also nach der DFP-Vergiftung keine wesentlichen Änderungen der Esteraseaktivität auf. Das könnte bedeuten, daß die reaktivierende Dephosphorylierung nur im lebenden, durchbluteten Gewebe auftritt. Oder die körpereigenen Reaktivatoren können das Diisopropylphosphorylierte Enzym nur sehr wenig dephosphorylieren und der in vivo beobachtete Anstieg ist auch schon in den ersten Stunden vorwiegend durch Neubildung des Fermentes bedingt. Darüber hinaus müßte jedoch erwogen werden, ob der anfängliche

rasche Aktivitäsanstieg von 98 % Hemmung auf 8o - 75 % Hemmung innerhalb 48 Stunden nur vorgetäuscht ist. Die Täuschung könnte durch unverändertes DFP bedingt sein, das im Gewebe abgelagert ist und erst beim Homogenisieren mit der Cholinesterase in innigen Kontakt gerät. Anders als in vitro wäre im lebenden Tier damit zu rechnen, daß im Laufe von 48 Stunden der größte Teil mit dem Blutstrom abtransportiert oder durch Zerstörung beseitigt wurde, so daß beim Homogenisieren keine weitere Hemmung eintreten würde. Auf Grund dieser Annahme wäre zu folgern, daß die Messungen kurz nach der Applikation des Giftes Werte ergeben, die niedriger sind als die wirkliche Enzymaktivität im lebenden Tier (23).

Frischgew. mg	Gewicht in mg nach: 24 Std.	48 Std.	72 Std.	Esteraseaktivität µMol/g Frischgew. x Std.
1 588	1450 (-8.7%)			557
1 360	1237 (-9.0%)			538
1 747		1461 (-16.0%)		583
1 524		1241 (-18.6%)		629
1 546			1107 (-28%)	533
1 558			1144 (-27%)	510

Tabelle 3: Cholinesteraseaktivität des Rattengehirns nach Stehenlassen des unversehrten Organs bei Zimmertemperatur. In Klammern %-Wasserverlust.

Die Klärung dieser Frage ist verschiedentlich versucht worden, jedoch ist bisher keine eindeutige Antwort darauf möglich gewesen (24). Die Lösung des Problems kann vielleicht erleichtert werden, wenn zum Vergleich Paraoxon herangezogen wird, denn der Diaethylphosphatrest läßt sich wesentlich leichter vom Enzym abtrennen als der Diisopropylphosphatrest. Allerdings ist Paraoxon auch weniger stabil als DFP und kann daher in vivo schneller zerstört werden.

Ein Versuch mit Paraoxon, der dem in Tabelle 2 aufgeführten analog ist, ergibt ein ganz anderes Resultat, das aus Tabelle 4 zu ersehen ist.

Frischgew. des 1/2 Gehirns mg	Esteraseaktivität in µMol/g x Std.				Hirngew. unmittelbar vor der Messung mg (Gewichtsverlust in %)
	sofort	nach 2o Std.	nach 44 Std.	nach 68 Std.	
62o	26.8				
74o	35.2				
841	29.8				
	3o.6 ±4				
863		199			665 (-23%)
811			338		475 (-41%)
68o				355	25o (-63%)

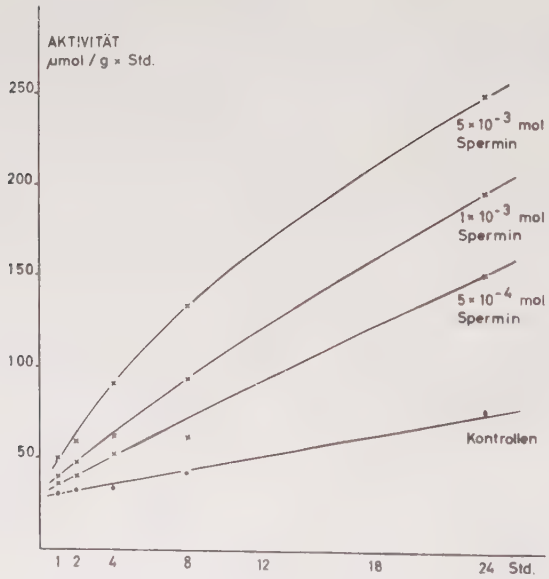
Tabelle 4: Zunahme der Cholinesteraseaktivität im Gehirn nach dem Töten Paraoxon-vergifteter Tiere (1.o mg/kg s.c.) und Aufbewahrung des Gewebes in offenen Gefäßen bei Zimmertemperatur. Für jede Bestimmung wurde die Hälfte eines Gehirns verwendet.

Hier ist ein erheblicher Anstieg der Fermentaktivität zu verzeichnen, der mit großer Wahrscheinlichkeit durch Reaktivierung bedingt ist. Als Reaktivator kommt z.B. das aliphatische Tetraamin Spermin in Betracht. Die Konzentration dieses Amins reicht mit ca. 5o γ/g Frischgewicht im Rattengehirn (25) für eine Reaktivierung jedoch nicht aus.

Eigene Untersuchungen der Sperminkonzentration im Rattengehirn ergaben 53.5 ± 5.8 γ/g Hirn. Die Base wurde nach Rosenthal und Tabor (25) bestimmt. Die Extraktion des Gewebes erfolgte mit 4 Teilen lo%iger Trichloressigsäure, die dann 3 x mit je 2o ml Aether ausgeschüttelt wurde, bis die Reaktion fast neutral war. Danach erfolgte Bindung des Spermins an einen Kationenaustauscher. Dazu diente eine Säule des Carboxylharzes Amberlite XE 64, K^+-Form, von 5o mm Höhe und 6 mm Ø. Die Säule wurde mit 3 ml H_2O und anschließend mit loo ml o.13 n CH_3COOH gründlich gewaschen und dann mit 3 ml 2.5 n HCl das Spermin eluiert. Die Bestimmung erfolgte durch Kupplung mit 2.4 Dinitro-1-fluorbenzol. Dazu wurden 9 ml des mit NaOH neutralisierten Eluates, o.5 ml gesättigte Boraxlösung und o.25 ml des DNFB-Gemisches (o.65 ml DNFB in 5o ml Aceton) bei P_H 9.5 lo Minuten lang im Wasserbad bei 7o °C inkubiert, dann mit o.5 ml 5 n HCl angesäuert und der gefärbte Komplex durch Ausschütteln mit 4 ml Essigester extrahiert. Die spektrophotometrische Bestimmung erfolgte bei 42o mμ im Beckman Spektrophotometer DU bei 1 cm Schichtdicke.

Mit dieser Methode wurde die Sperminkonzentration auch in

Gehirnen bestimmt, die 24 Stunden an der Luft getrocknet wurden. Hier fanden sich 139 ± 14.8 γ/g, d.h. die Konzentration war von 2.5 x 10^{-4} auf 7 x 10^{-4} gestiegen. Diese Konzentration ist wie Abb. 1 zeigt, durchaus im Stande eine Reaktivierung herbeizuführen.



REAKTIVIERUNG DER MIT PARAOXON GEHEMMTEN CHOLINESTERASE IM HIRNHOMOGENAT VON RATTEN DURCH SPERMIN BEI ZIMMERTEMPERATUR

Abb. 1

Das würde erklären, weshalb der Anstieg der Enzymaktivität nur zustande kommt, wenn das Gewebe austrocknet. Wird das Gehirn in einer feuchten Kammer aufbewahrt oder als Homogenat im verschlossenen Gefäß, dann ist der Aktivitätsanstieg wesentlich geringer und auch die Sperminkonzentration entsprechend kleiner.

Daraus geht nun hervor, daß ein Aktivitätsanstieg, der in vivo später als 48 Std. nach der Vergiftung eintritt, beim DFP auf keinen Fall durch Reaktivierung zustande kommt, sondern als Fermentneubildung betrachtet werden kann. Dementsprechend wurde die Beobachtungsperiode am 2. Tage nach der s.c. Injektion von DFP begonnen und nach 1o - 2o Tagen beendet. Die Tiere wurden nach verschiedenen Zeitabständen getötet, und die Gewebe zur Cholinesterasebestimmung verwendet.

C. Methodik der Cholinesterasebestimmung

Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität wurde im Warburg-Apparat unter O_2-Abschluß nach dem Vorschlag von Ammon (26) durchgeführt. Dabei wird das infolge der Esterhydrolyse aus einem Bikarbonatpuffer (27) freigesetzte CO_2 manometrisch gemessen. Nach

$$\begin{array}{l} CH_2O - CO\,CH_3 \\ | \\ CH_2 \;\; - N^+(CH_3)_3 \\ \qquad Cl^- \end{array} + H_2O \xrightarrow{\text{Esterase}} \begin{array}{l} CH_2\,OH \\ | \\ CH_2 - N^+(CH_3)_3 \\ \qquad Cl^- \end{array} + CH_3COOH$$

zeigt jedes Mol freigesetztes CO_2 die Hydrolyse von einem Mol Ester an.

Der täglich frisch bereitete Puffer hatte nach Durchströmen mit einem Gemisch von Stickstoff und CO_2 im Verhältnis von 95 % : 5 % ein P_H von 7.4

und war folgendermaßen zusammengesetzt:

	Endkonzentration
NaCl	1.15×10^{-1} Mol
$NaHCO_3$	3.36×10^{-2} Mol
KCl	2.40×10^{-3} Mol
$CaCl_2$	1.2×10^{-3} Mol

Als Substrat für die Messungen wurde meistens Acetylcholin und nur gelegentlich zur Differenzierung der Acetylcholinesterase von der Serumcholinesterase auch Acetyl-ß-Methylcholin (Mecholyl) oder Butyrylcholin verwendet. Mecholyl wir nur von der Acetylcholinesterase und Butyrylcholin nur von der Serumesterase gespalten, während Acetylcholin von beiden Fermenttypen hydrolysiert wird. Das Substrat befand sich in 0.2 ml Puffer gelöst im Anhang der kastenförmigen Warburggefäße.

Die optimale Substratkonzentration im Reaktionsansatz beträgt für Acetylcholinesterase 4×10^{-3} Mol. Sowohl bei höherer als auch bei geringerer Substratkonzentration ist die Aktivität des Fermentes niedriger. Bei der Serumcholinesterase dagegen steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration an. Demzufolge wurde Butyrylcholin in der Konzentration 10^{-2} Mol benutzt.

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität wurden Homogenate der zu untersuchenden Gewebe in einer Konzentration von 10 - 30 mg Feuchtgewicht/ml Puffer verwendet. Die Versuchstemperatur betrug 35°, die Schüttelfrequenz 100/min. Als Vorperiode zwecks Angleichung der Temperatur im Reaktionsgefäß wurden 15 min. gewählt und nach Vereinigung des Homo-

genates mit dem Substrat erfolgte je nach Spaltungsgeschwindigkeit eine 15 - 6o min. dauernde Messperiode, in der alle 3, 5 oder lo min. abgelesen wurde.

Das Töten der Tiere erfolgte durch Dekapitation.
Die Cholinesteraseaktivität wurde in
µMol gespaltenes ACh/g Feuchtgewicht des Gewebes x Stunde oder in µMol gespaltenes ACh pro Rattenhirn x Stunde angegeben.

D. Versuche über die Synthese von Cholinesterase nach DFP-Vergiftung

Die Cholinesteraseaktivität im Embryonalstadium und in den ersten Tagen nach der Geburt wurde bei Ratten wiederholt untersucht. Dabei fand sich eine Zunahme, die der Entwicklung des Nervensystems etwa entspricht. Nach ca. 3 Wochen ist eine konstante Höhe erreicht, die sich nicht weiter ändert (28 - 3o).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geprüft, ob die Fermentaktivität auch im höheren Lebensalter der Tiere unverändert bleibt. In Tabelle 5 sind die im Gehirn, im Zwerchfell und im Musculus gastrocnemius gemessenen Werte zusammengefaßt. Die Konzentration an Cholinesterase liegt bei jungen Tieren in den 3 untersuchten Organen höher als bei alten Ratten. Wird dagegen die Cholinesteraseaktivität des gesamten Organs errechnet, so kehren sich die Relationen um. Daraus kann geschlossen werden, daß die Gewichtszunahme des Gehirns und der untersuchten Muskeln mit steigendem Alter, vorwiegend durch die Vermehrung derjenigen Gewebselemente bedingt ist, die keine Cholinesterase enthalten.

In den folgenden Versuchen wurde deshalb jeweils die Konzentration und die im ganzen Organ enthaltene Aktivität der Acetylcholinesterase angeführt.

Eine nachträgliche Aufstellung über die Toxicität von DFP aus den Versuchsprotokollen ergibt, daß nach einer Dosis von 2 mg/kg s.c. von 8o Ratten im Gewicht zwischen 55 und 11o g, 16 starben, bei den älteren Tieren zwischen 28o und 35o g dagegen 17 von 29.

Ratten Gew. g	Gewebe g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
7o- 9o	1.41±o.13	648±11	915	2o
13o-2oo	1.6o±o.13	6o8±16	97o	76
>28o	1.8o±o.12	553±22	995	16
Gehirn				
7o-9o	o.18±o.o6	119±15	21.5	16
13o-2oo	o.45±o.o9	79± 8	36	84
>28o	o.72±o.o5	64± 7	46	2o
Zwerchfell				
7o- 9o	o.13±o.o1	98±8	13.2	2o
13o-2oo	o.33±o.o4	85±12	28	56
>28o	o.64±o.o5	44±8	28	48
M. gastrocnemius				

Tabelle 5: Cholinesteraseaktivität im Gehirn, Zwerchfell und M. gastrocnemius von Ratten verschiedenen Alters.

Die Toxicität von DFP ist somit bei alten Tieren größer als bei jungen.

Als Ursache für die gesteigerte Empfindlichkeit der alten Ratten können folgende Möglichkeiten erwogen werden:

1) Im Verhältnis zum Körpergewicht, worauf sich die Dosierung bezieht, ist bei den leichteren, d.h. jungen Tieren mehr Enzym vorhanden als bei den schweren älteren Ratten. Dadurch ist der Quotient Hemmstoff zu Enzym bei schweren Tieren größer als bei leichten.

2) Junge Ratten könnten DFP entweder durch beschleunigte Ausscheidung oder durch gesteigerten Abbau schneller eleminieren als alte.

3) Die Fähigkeit zur Reaktivierung der phosphorylierten, d.h. gehemmten Cholinesterase könnte bei jungen Tieren stärker ausgeprägt sein und

4) könnte eine höhere Synthesegeschwindigkeit der Cholinesterase die Empfindlichkeit für Alkylphosphate vermindern.

Die erwähnten Veränderungen der Cholinesteraseaktivität mit zunehmendem Alter und Gewicht sprechen dafür, daß die unter 1) aufgeführte Möglichkeit wenigstens zum Teil die Steigerung der Empfindlichkeit herbeiführt.

Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung der Geschwindigkeit, mit der Acetylcholinesterase im Gehirn synthetisiert wird, ein beachtlicher Unterschied zwischen jungen und alten Ratten (Tabelle 6, Abb. 2).

Junge Tiere

Tage nach DFP	Gew. g	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	% der Normal-aktivität	Anzahl der Tiere
2	7o	1.33±o.o7	149± 5	21o	23	4
3	7o	1.37±o.o5	182± 9	256	28	4
	75	1.32±o.1o	199±11	281	3o.7	4
5	75	1.38±o.o8	27o± 8	38o	41.5	4
6	9o	1.44±o.13	29o±1o	41o	45	4
9	85	1.39±o.o9	355±17	5oo	55	4
12	1oo	1.45±o.11	412±12	58o	63.5	4
13	1oo	1.48±o.1o	43o±15	6o5	66	4

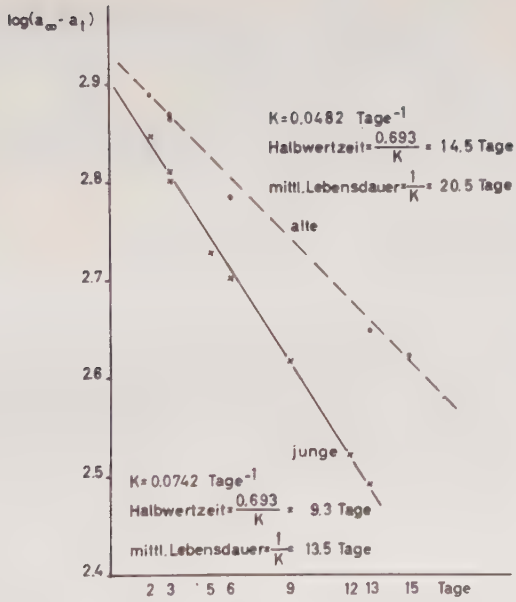
Alte Tiere

2	36o	1.86±o.13	11o± 6	198	2o	3
3	285	1.83±o.o9	136±1o	245	24.6	4
3	225	1.76±o.1o	145± 7	261	26	2
6	235	1.85±o.o8	215± 9	388	39	2
13	355	1.95±o.o8	3oo±12	54o	54	2
15	37o	1.96±o.1o	32o±18	575	58	2

Tabelle 6: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns von Ratten nach Applikation von 2.o mg/kg DFPs.c.

Als Maß für die Synthesegeschwindigkeit kann die aus den Messdaten errechnete mittlere Dauer der Hemmung und deren sogenannte Halbwertzeit benutzt werden, weil die Hemmung durch Synthese von aktivem Ferment vermindert wird. Somit ist der Rückgang der Hemmung ein Kriterium für die Bildung von Acetylcholinesterase.

Der Differentialquotient der Aktivitätsänderung (da) nach der Zeit (dt) ist durch die Synthesegeschwindigkeit (K_b) abzüglich der Abbaugeschwindigkeit (K_z) gegeben. Durch Einführung des Faktors a wird der Abhängigkeit dieser Größen



GESCHWINDIGKEIT DES AKTIVITÄTSANSTIEGS DER CHOLINESTERASE IM GEHIRN (BEZOGEN AUF DAS GESAMTORGAN) VON RATTEN NACH APPLIKATION VON 2.0 mg / kg DFP s.c.
——— Tiere zwischen 70 - 100 g
– – – Tiere über 350 g

Abb. 2

von der jeweiligen Enzymkonzentration Rechnung getragen.

$$\text{Somit ist } \frac{da}{dt} = K_b - K_z \cdot a$$

Im normalen, nicht vergifteten Gewebe sind K_b und $K_z \cdot a$ gleich groß, so daß $\frac{da}{dt} = o$ ist.
Somit nähert sich der Differentialquotient $\frac{da}{dt}$ auch nach der Einwirkung von DFP dem Wert O. Dann ist a, das für diesen Fall den Index ∞ tragen soll, gleich dem Quotienten $\frac{K_b}{K_z}$.
Durch Integration der Differentialgleichung erhält man dann:

$$\text{I)} \qquad \int_{a_o}^{at} \frac{da}{K_b - K_z \cdot a} = \int_{\infty}^{t} dt = t$$

a_o = Aktivität unmittelbar nach der DFP-Einwirkung

at = Aktivität zur Zeit t nach der DFP-Einwirkung

Um diese Gleichung lösen zu können, wird der Ausdruck

$K_b - K_z \cdot a = u$ gesetzt.

Hieraus folgt:

$$\frac{du}{da} = \frac{- K_z \cdot a + K_b}{da}$$

Da nach den Regeln der Differentialrechnung in dieser Gleichung $\frac{a}{da} = 1$ und $\frac{K_b}{da} = O$ werden, ist

$$\frac{du}{da} = - K_z \quad \text{oder}$$

$$da = - \frac{1}{K_z} \cdot du$$

In die Gleichung I) eingesetzt, ergibt

$$\int_{a_o}^{at} \frac{da}{K_b - K_z \cdot a} = t$$

oder $$\int_{a_o}^{a_t} \frac{-\frac{1}{K_z} \cdot du}{u} = t$$

Dann ist $$t = -\frac{1}{K_z} \int_{a_o}^{a_t} \frac{du}{u}$$

Hieraus folgt: $\int \frac{du}{u} = \ln u + \text{Konstante}$

$$t = -\frac{1}{K_z} \cdot \ln u \Big|_{a_o}^{a_t}$$

$$t = -\frac{1}{K_z} \cdot \ln (K_b - K_z \cdot a) \Big|_{a_o}^{a_t}$$

Da $K_b = K_z \cdot a_\infty$ ist, erhält man

$$t = -\frac{1}{K_z} \cdot \ln (K_z \cdot a_\infty - K_z \cdot a) \Big|_{a_o}^{a_t}$$

$$t = -\frac{1}{K_z} \cdot \ln K_z (a_\infty - a) \Big|_{a_o}^{a_t}$$

Durch Einsetzen der Werte a_o bis a_t für a wird

$$t = -\frac{1}{K_z} \left[\ln K_z (a_\infty - a_t) - \ln K_z (a_\infty - a_o) \right]$$

$$t = -\frac{1}{K_z} \ln \frac{K_z}{K_z} \frac{(a_\infty - a_t)}{(a_\infty - a_o)}$$

$$\ln \frac{(a_\infty - a_t)}{(a_\infty - a_o)} = -K_z \cdot t$$

Da der $\ln a = 2.3o3 \lg a$ ist, wird

$$2.3o3 \cdot \lg \frac{(a_\infty - a_t)}{(a_\infty - a_o)} = -K_z \cdot t$$

$$K_z = -\frac{2.303}{t} \cdot \lg \frac{(a_\infty - a_t)}{(a_\infty - a_o)} \quad \text{oder II)}$$

$$K_z = -\frac{2.303}{t} \cdot \lg (a_\infty - a_t) - \lg (a_\infty - a_o)$$

Die graphische Darstellung ergibt nach dem Ansatz

$\frac{da}{dt} = K_b - K_z \cdot a$ eine gradlinige Abnahme des log der Hemmung mit der Zeit, also eine Exponentialfunktion (Abb.2).

Aus dieser graphischen Darstellung, die nach den Werten aus Tabelle 6 gezeichnet wurde, lassen sich die Werte für $\log (a_\infty - a_t)$ und $\log (a_\infty - a_o)$ ablesen und erlauben, in die Formel II) eingesetzt, die Berechnung von K_z.

$$\frac{K_z}{2.303} = \frac{2.906 - 2.584}{10} = 0.032$$

Daraus errechnet sich:

$K_z = 0.0322 \cdot 2.303 = 0.074$ Tage^{-1}

Dann beträgt die Halbwertzeit $= \frac{0.693}{K_z} = \frac{0.693}{0.074} = 9.3$ Tage

und die mittlere Dauer der Hemmung $= \frac{1}{K} = 13.5$ Tage

für die jungen Tiere. Bei alten Tieren dagegen waren die Halbwertzeit mit 14.5 Tagen und die mittlere Dauer der Hemmung mit 20.5 Tagen wesentlich länger.

Maurer und Mitarbeiter (31) berechneten aus ihren Versuchen mit markierten Aminosäuren für Hirneiweiß bei Mäusen eine Halbwertzeit von 8.9 Tagen und eine mittlere Lebensdauer von 12.8 Tagen (Tabelle 1). Diese Werte stimmen mit den hier ermittelten überein. Das beruht selbstverständlich auf einem Zufall, denn in Maurers Untersuchungen handelt es sich um einen Durchschnittswert für eine große Zahl von Eiweißen, die sicher nicht alle mit der

gleichen Geschwindigkeit synthetisiert werden. Dennoch zeigt diese Übereinstimmung der Halbwertzeiten, daß die Größenordnung der hier bestimmten Syntheserate etwa der physiologischen entspricht. Das bedeutet andererseits, daß es für das auf- und abbauende Fermentsystem gleichgültig ist, ob die Cholinesterasemoleküle phosphoryliert und damit gehemmt sind oder ob sie biologisch aktiv sind.

Immerhin wäre eine Art Selbstregulation der Synthese oder des Abbaues denkbar, die von der aktuell vorhandenen Enzymaktivität bestimmt wird. Z. B. könnte die Synthese infolge erhöhter Substratkonzentration oder verminderter Konzentration der Spaltprodukte stimuliert werden. Derartige Mechanismen sind aus Untersuchungen über Fermentsynthesen bei Mikroorganismen durchaus bekannt. Bei der Synthese von Acetylcholinesterase im Rattengehirn spielen sie sicher keine wesentliche Rolle. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Versuchen mit dem reversiblen Cholinesterasehemmstoff Eserin. Nach 17 tägiger Behandlung der Ratten mit hohen Dosen von Eserin war die Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn nicht höher als bei den Kontrollen (Tabelle 7). Eserin erzeugt nach Untersuchungen von Herken und Neubert (32) einen Anstieg der Konzentration von Acetylcholin auf etwa das Doppelte. Dementsprechend sollten die Spaltprodukte in verminderter Menge auftreten. Falls ein "Feed-back" Mechanismus im Spiele ist, müßte also eine gesteigerte Synthese von Acetylcholinesterase dadurch hervorgerufen werden. Aber auch bei Tieren, die nach der Applikation von DFP täglich Eserin erhielten, war am 18. Tag nur eine geringfügig höhere Esteraseakti-

vität festzustellen (Tabelle 8). Wenn überhaupt, dann spielt diese Art der Stimulierung der Fermentsynthese unter den gegebenen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 7: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn alter Albino-Ratten (über 3oo g schwer), die mit Eserin behandelt wurden.

Folgende Dosen Eserin wurden s.c. appliziert:

am 1. und 2. Versuchstag 2 x täglich je o.5 mg/kg
am 3. und 4. Versuchstag 1 x täglich je o.8 mg/kg
am 5. und 6. Versuchstag 1 x täglich je 1.o mg/kg
vom 7. bis 11. Versuchstag 2 x täglich je 1.o mg/kg
12. bis 16. Versuchstag 2 x täglich je 1.2 mg/kg

untersucht am	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
1o. Tag	1.68±o.1o	582±19	976	4
17. Tag	1.69±o.1o	559±23	945	4
Kontrollen	1.8o±o.12	553±22	995	16

Tabelle 8: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn alter mit 1.4 mg/kg DFP s.c. vergifteter Albino-Ratten, die mit Eserin behandelt wurden.

Die Tiere erhielten vom 2. Tag an nach DFP folgende Mengen Eserin:

am 2. Tag 1 x täglich o.6 mg/kg s.c. Eserin
am 3. Tag 1 x täglich o.3 mg/kg s.c. Eserin
4.+5. Tag 1 x täglich o.4 mg/kg s.c. Eserin
6. Tag 1 x täglich o.5 mg/kg s.c. Eserin
7. Tag 1 x täglich o.6 mg/kg s.c. Eserin
8. Tag 2 x täglich o.6 mg/kg s.c. Eserin
9. Tag 2 x täglich o.8 mg/kg s.c. Eserin
1o. Tag 1 x täglich 1.o mg/kg s.c. Eserin
11.-16. Tag 2 x täglich 1.o mg/kg s.c. Eserin

18. Tag nach DFP	1.66±o.o7	387±25	642	4
Kontrollen				
17. Tag nach DFP	1.74±o.12	348±17	6o5	5

E. Versuche über die Beeinflussung der Synthesegeschwindigkeit der Cholinesterase nach der DFP-Vergiftung

1) Ernährungsfaktoren

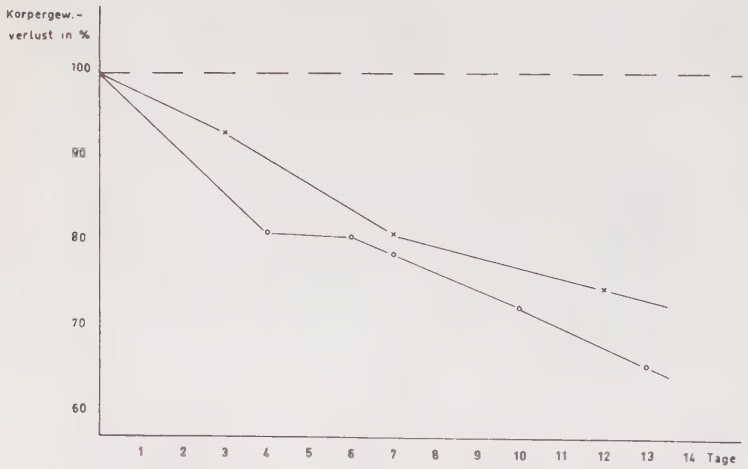
Bevor der Einfluß von Arzneistoffen auf die Synthese von Cholinesterase untersucht werden konnte, war es notwendig zu prüfen, ob und inwieweit Ernährungsfaktoren hier eine Rolle spielen. Aus diesem Grunde wurden einige Tiergruppen unter verschiedener, sehr extrem einseitiger Ernährung gehalten.- In welchem Ausmaß die Fermentsynthese des Gehirns unter einem ganz allgemeinen Mangel an Nährstoffen Störungen erleidet, sollte durch Untersuchung hungernder Tiere geklärt werden.

a) Nahrungsentzug

Ratten von mehr als 280 g Körpergewicht verlieren innerhalb 12 - 13 Tagen 25 % ihres Gewichtes, wenn sie keine Nahrung erhalten, sondern nur Wasser ad libitum (Abb. 3). Das Hirngewicht verändert sich nicht und die Cholinesteraseaktivität des Gehirns bleibt ebenfalls konstant (Tabelle 9). Erhalten die Tiere am 1. Hungertage 1.4 mg/kg DFP s.c., dann sinkt ihr Körpergewicht innerhalb 13 Tagen sogar um 35 % (Abb. 3). Dennoch ändert sich auch bei diesen Tieren das Hirngewicht nicht, und der Anstieg der Cholinesteraseaktivität erfolgt mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei den Kontrolltieren, die ad libitum ein optimales Futter erhielten (Tabelle 9).

behandelt mit	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Versuchsdauer Tage	Anz. der Tiere
hungernde Tiere	1.79	542	97o	2	2
	1.79	528	945	2	2
	1.71	617	1o5o	3	2
	1.87	518	968	4	2
	1.69	573	968	8	2
	1.74	545	947	12	2
	1.76±o.11	554±32	975		
unbehandelte Kontrollen	1.8o±o.12	553±23	995		16
hungernde Tiere + DFP	1.79±o.o9	248	443	11	2
	1.79±o.13	313	56o	14	2
normal ernährte Kontrollen + DFP	1.96±o.1o	32o±18	575	14	2

Tabelle 9: Aktivität der Cholinesteraseaktivität im Gehirn hungernder alter Albino-Ratten (über 28o g schwer), die zum Teil mit 1.4 mg/kg DFP s.c. vergiftet worden waren.



Gewichtsverluste (in %) alter Albino-Ratten (> 280 g), die 12 bzw. 13 Tage lang hungerten x——x und außerdem mit 1,4 mg/Kg DFP s.c. vergiftet worden waren o——o.

Abb. 3

b) Verfütterung von Hafer, Zucker oder Fleisch

Bei einer zweiten Gruppe von Ratten wurde durch die ausschließliche Verfütterung von Hafer eine sehr einseitige Ernährung vorgenommen. Eine dritte Gruppe erhielt aus dem gleichen Grunde nur gewöhnlichen Würfelzucker, und die letzte Gruppe bekam vorwiegend frisches Muskelfleisch von Pferden, unter Zusatz eines käuflichen Fertigfutters, das sonst als Alleindiät gefüttert wird.

Diät und Behandlung	Versuchsdauer Tage	Hirngew.	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
Standardfutter + Fleisch	15	1.87±o.o8	512±24	957	3
Zucker	3	1.68±o.o8	6o3	1o12	2
	4	1.66±o.1o	52o	863	2
	4	1.82±o.o5	533	97o	2
	8	1.77±o.o7	561	991	2
	12	1.67±o.13	573	958	2
			558±29	959	
Standardfutter		1.8o±o.12	553±22	995	16
Hafer + DFP	3	1.49±o.13	1o2± 8	153	2
	7	1.84±o.1o	181± 6	332	3
	1o	1.66±o.o8	254±11	422	3
	17	1.71±o.11	322±18	55o	3
	21	1.64±o.12	42o±13	689	3
Standardfutter + Fleisch+ DFP	15	1.82±o.15	314±12	571	3
Standardfutter + DFP	15	1.96±o.1o	32o±18	575	2
	2o	1.64±o.13	394	646	2

Tabelle 1o: Aktivität der Cholinesterase im Gehirn alter Albino-Ratten (über 25o g schwer), denen Hafer, Fleisch oder Zucker verfüttert wurde und die zum Teil mit 1.4 mg/kg DFP s.c. vergiftet worden waren.

2) Unterbinden der Carotiden

Die vorangegangenen Versuche zeigten, daß das Gehirn bei einem Nährstoffmangel des Organismus lange Zeit verschont bleiben kann. Das Hirngewicht und die Geschwindigkeit der Fermentsynthese bleiben konstant, obwohl sich das Körpergewicht der Tiere erheblich vermindert. Aus diesem Grunde wurde versucht, auf andere Weise einen Nährstoffmangel im Gehirn hervorzurufen.

Bei Ratten ist die Unterbindung einer Carotis ohne lebensgefährliche Folgen. Man kann in einer zweiten Operation sogar die zweite Arteria Carotis unterbinden, ohne das Tier zu töten. Dennoch darf wohl angenommen werden, daß diese Unterbindungen zumindest vorübergehend zu einer Minderdurchblutung des Gehirns und damit zu einem partiellen Nährstoffmangel führen. Das könnte dann zum Ausdruck kommen, wenn, wie im Falle der DFP-Vergiftung, an die Eiweißsynthese besondere Anforderungen gestellt werden.

Dies zu prüfen, wurden jungen männlichen und weiblichen Ratten, im Gewicht zwischen 7o und 9o g, im Abstand von einer Woche, die Halsschlagadern unterbunden. Eine Woche nach der letzten Operation erfolgte die Vergiftung der Tiere mit je 1.5 mg/kg DFP s.c.. Die Sterbequote betrug 2o %. Die Hirnesteraseaktivität wurde am 1. und 6. Tag nach der Applikation des DFP gemessen (Tabelle 11).

Die Werte in Tabelle 11 zeigen keinen Unterschied zwischen operierten und nicht operierten Tieren. Hirngewichte und Cholinesteraseaktivität sind bei beiden Gruppen gleich.

Da bei derselben Dosierung von DFP auch das Ausmaß der Aktivitätshemmung gleich ist, muß angenommen werden, daß die Durchblutung des Gehirns durch die Unterbindung der Carotiden nicht vermindert wurde.

	Körper-gewicht g	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
			am 1. Tag nach DFP		
operierte Tiere	105±15	1.40±0.01	110	155	2
Kontrollen	130±15	1.45±0.05	132±12	191	3
			am 6. Tag nach DFP		
operierte Tiere	130	1.43±0.02	296	423	2
Kontrollen	125±10	1.42±0.03	306±26	434	3

Tabelle 11: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns junger E3-Ratten, denen die Halsschlagadern abgebunden wurden, nach der Applikation von 1.5 mg/kg DFP s.c. im Vergleich zu Kontrollwerten.

3) Hormonelle Faktoren und Vitamine

Die Unterschiede im Anstieg der Cholinesteraseaktivität bei Tieren verschiedenen Alters veranlaßte zu prüfen, ob hormonelle Faktoren dafür verantwortlich sind. Dabei lag es nahe, zunächst das Wachstums- oder Somatotrope-Hormon (STH) zu untersuchen.

a) STH und Vitamin B_{12}

STH führt nach Prudden und Mitarbeitern (33) im Tierver-

such zu einer verstärkten Proteinsynthese. Die Aminosäurekonzentration des Blutes und die N-Ausscheidung im Harn nehmen ab. Greenbaum und Mc Lean (34) beobachteten, daß unter der Einwirkung von STH die Depotfette mobilisiert und für die gesteigerte Proteinsynthese verwendet werden.

Für die eigenen Experimente wurden alte Ratten im Gewicht über 25o g verwendet, weil eine etwaige Beschleunigung der Umsatzgeschwindigkeit bei diesen besonders deutlich in Erscheinung treten sollte. Die Tiere erhielten 1.5 mg/kg DFP s.c. und vom nächsten Tage an bis zum Versuchsende nach 21 Tagen täglich intraperitoneale Injektionen von Somatotropin.+ In den ersten 4 Tagen betrug die Dosis 1 mg/kg, wurde dann auf 2 x 1 mg/kg und vom 8. Tage ab auf 2 x 2 mg/kg gesteigert.

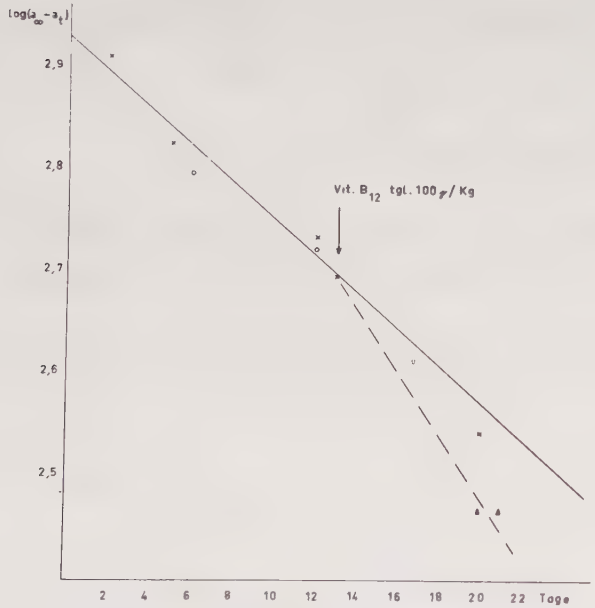
Am 6. und 12. Tag zeigten sich keine Unterschiede der Cholinesteraseaktivität des Gehirns zwischen den mit STH behandelten und den nicht behandelten Tieren (Abb. 4). Vom 13. Tag ab erhielten die Tiere zusätzlich loo µg Vit. B_{12}/kg/Tag i.p.. Am 2o. und 21. Tag waren die Werte der behandelten Tiere deutlich höher als die der Kontrollen. Die Ergebnisse stammen jeweils von mindestens 3 Versuchstieren.

Somit ist die gesteigerte Synthese der Cholinesterase bei jungen Tieren nicht als Funktion des Wachstumshormons aufzufassen. Eine besondere Bedeutung des Vitamin B_{12} bei der Enzymsynthese ist durch diese Versuche nicht bewiesen, muß aber als möglich angesehen werden. Es wäre denkbar, daß

+ Das Hormonpräparat wurde freundlicherweise von der Firma Parke Davis & Company, Detroit Michigan, USA, zur Verfügung gestellt, wofür ich mich herzlich bedanke.

Cyanocobalamin in der Flora des Darmes junger Ratten in größerer Menge entsteht oder besser resorbiert wird.

In der Absicht dieser Arbeit lag es zunächst, einen Überblick über die Möglichkeiten der Beeinflussung der Enzymsynthese zu gewinnen. Aus diesem Grunde wurde der Befund mit Vitamin B_{12} vorerst nicht weiter verfolgt, sondern der Einfluß anderer inkretorischer Drüsen untersucht.



Geschwindigkeit des Aktivitätsanstiegs der Cholinesterase im Gehirn (bezogen auf das Gesamtorgan) alter über 250 g schwerer Ratten, nach Applikation von 1,5 mg/kg DFP s.c. und Behandlung mit STH und Vitamin B_{12}. Jeder Punkt der Kurve gibt den Mittelwert von mindestens 3 Tieren an.

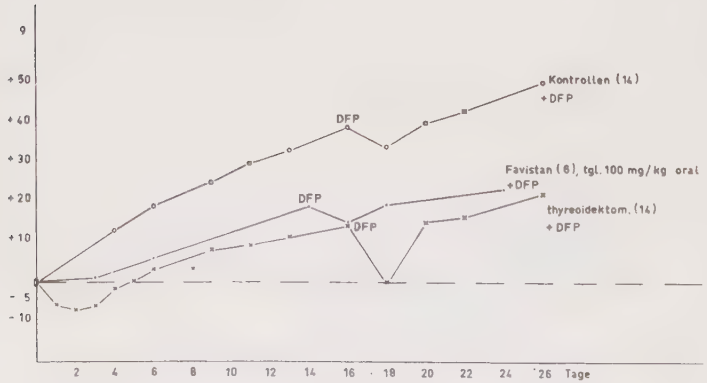
×—× Kontrollen
o—o mit STH behandelte Tiere
Δ---Δ mit STH und Vit. B_{12} behandelte Tiere

Abb. 4

b) Thyreoidektomie

Unter diesen gehört die Schilddrüse zu denen mit besonders ausgeprägter Wirkung auf den Stoffwechsel. Deshalb wurde die Fermentsynthese nach operativer Entfernung der Thyreoidea, nach wiederholter Applikation von Schilddrüsenhormon und nach mehrtägiger Behandlung mit einem Thyreostatikum untersucht. Für die Experimente nach Thyreoidektomie und nach thyreostatischer Behandlung erschienen junge Ratten geeigneter, weil eine Verminderung der Bildungsrate zu erwarten war, die bei höheren Ausgangswerten besser erkennbar sein sollte. Das Umgekehrte sollte für Versuche mit Schilddrüsenhormon gelten, so daß dafür alte Ratten verwendet wurden.

Die Thyreoidektomie führte, wie die nebenstehende Kurve (abb. 5) zeigt, zu einer wesentlichen Verlangsamung des Wachstums.



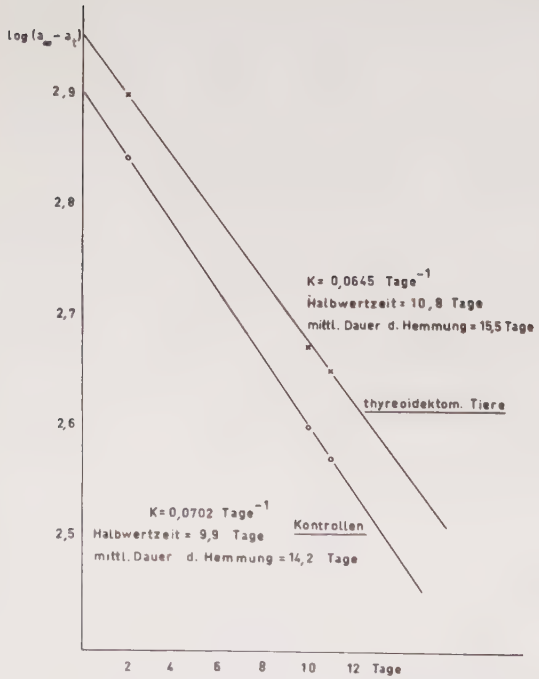
Durchschnittl. Körpergewichtsveränderungen junger Ratten (100g), die z.T mit Favistan behandelt wurden oder thyreoidektomiert waren, vor und nach der Applikation von 1,5 mg/kg DFP s.c. Jeder Punkt der Kurve zeigt den Mittelwert des Körpergewichtes der in Klammern angegebenen Anzahl Tiere an. 0 = Ausgangsgewicht bzw. Tag der Thyreoidektomie

Nach 16 Tagen zeigten die nicht operierten Tiere gleichen Ausgangsgewichtes von durchschnittlich 1oo g eine Gewichtszunahme von 38 ± 7 g. Die thyreoidektomierten Tiere nahmen jedoch bei dem gleichen Futterangebot nur 13 ± 6 g zu, d.h. 66 % weniger. Das verminderte Wachstum wurde als Kriterium des Mangels an Schilddrüsenhormon gewertet. Beide Tierserien erhielten dann 1.5 mg/kg DFP s.c.. Von den Kontrollen starben bei dieser Dosierung 2 von 14, also 15 %. Von den thyreoidektomierten starben 8 von 17, also 5o %. Die operierten Tiere sahen kräftig aus und hatten keine Zeichen, die auf eine allgemein verminderte Resistenz gegen Schädlichkeiten hinweisen könnten.

Die Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber DFP infolge der Thyreoidektomie könnte z.B. durch eine Verminderung des Fettanteils am Körpergewicht bedingt sein, oder sie könnte eine Folge verlangsamter Entgiftungsreaktionen oder verminderter Ausscheidung darstellen. Eine Entscheidung darüber läßt sich aus den vorliegenden Daten nicht ableiten.

Die in Tabelle 12 zusammengefaßten Analysenergebnisse zeigen, daß die Fermenthemmung bei den thyreoidektomierten Ratten deutlich stärker ist als bei den Kontrollen. Damit ist die größere Empfindlichkeit der operierten Tiere erklärt. Jedoch wird von den schilddrüsenlosen Tieren auch langsamer synthetisiert.(Abb. 6). Die Halbwertzeit der Hemmung beträgt bei der thyreoidektomierten Ratte 1o.8 Tage im Vergleich zu 9.9 Tagen bei normalen Tieren. Daraus errechnet sich eine mittlere Dauer der Hemmung von 15.5 Tagen

während sie bei normalen Tieren 14.2 Tage beträgt.- Die normale Cholinesteraseaktivität verändert sich im Laufe von 2 Wochen nach Entfernung der Schilddrüse nicht, wie Tabelle 13 zeigt.



Geschwindigkeit des Aktivitätsanstiegs der Cholinesterase im Gehirn (bezogen auf das Gesamtorgan) thyreoidektom. und nicht operierter junger Ratten nach Applikation von 1,5 mg/kg DFP s.c

Abb. 6

Behandlung	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
		2. Tag nach DFP		
thyreoidekt. Tiere	1.35±0.09	89±17.5	120	4
Kontrollen	1.49±0.08	143± 5.1	213	4
		10. Tag nach DFP		
thyreoidekt. Tiere	1.37±0.11	324±25.7	444	3
Kontrollen	1.50±0.12	344± 8.6	516	4
		11. Tag nach DFP		
thyreoidekt. Tiere	1.42±0.10	331± 9.9	467	2
Kontrollen	1.46±0.08	370± 5.5	540	4

Tabelle 12: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns thyreoidektomierter und nicht operierter junger E3-Ratten, nach der Applikation von 1.5 mg/kg DFP s.c.

Behandlung	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
thyreoidekt. Tiere	1.45±0.10	657±12.8	952	5
Kontrollen	1.46±0.11	666±13.1	971	6

Tabelle 13: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns unvergifteter thyreoidektomierter junger E3-Ratten (100 g) am 13. Tag nach der Operation und unbehandelter Kontrolltiere

c) Thyreostatika

Ähnlich wie die Thyreoidektomie wirkte sich die Applikation eines Thyreostatikums aus. Gewählt wurde eines der wirksamsten Präparate aus dieser Klasse, nämlich 1-Methyl-2-Mercaptoimidazol, "Favistan" der Firma Asta+, das die Bildung von Schilddrüsenhormon durch Hemmung des Jodeinbaues in die organische Bindung vermindert. Eine erste Serie von 2o Tieren im Gewicht um loo g erhielt nach 6tägiger Vorbehandlung mit täglich 5o mg/kg Favistan, in 1%iger wässriger Lösung oral, 1.5 mg/kg DFP s.c.. Die Gewichtszunahme betrug bis dahin 6 g, d.h. ca. 7o % weniger als die der nichtbehandelten Tiere und war damit etwa so groß wie bei der Serie der Thyreoidektomierten. Die Applikation von Favistan wurde bis zum Versuchsende am 3. bzw. lo. Tag nach der DFP-Vergiftung fortgesetzt. Aus Tabelle 14 geht hervor, daß Favistan in der angeführten Dosis die normale Cholinesteraseaktivität des Gehirns nicht beeinflußt. Auch die Hemmung durch DFP und die Anstiegsrate der Enzymaktivität werden nicht verändert.

Anders war es bei der doppelten Favistandosis, also loo mg/kg oral täglich. Die Behandlung mit Favistan wurde 2 Wochen vor der DFP-Applikation (1.5mg/kg s.c.) begonnen und bis z. Versuchsende weitergeführt. Die Gewichtszunahme betrug 19 g in 2 Wochen (Abb. 5), d.h. sie war etwa so stark verringert wie bei der vorigen Gruppe. In diesem Versuch (Tabelle 15) zeigte sich am lo. Tag nach der DFP-Applikation eine deutlich geringere Cholinesteraseaktivität des

+Das Präparat wurde mir von der Herstellerfirma unentgeltlich zur Verfügung gestellt, wofür ich mich sehr bedanke.

Gehirns als bei den Kontrolltieren. Auch diese höhere Dosis hatte die normale Aktivität nicht beeinflußt. Die Behandlung mit dem Thyreostatikum bewirkte an der Cholinesteraseaktivität des Gehirns also das Gleiche wie die Entfernung der Schilddrüse, jedoch war die Empfindlichkeit der Tiere gegen DFP, gemessen an der tödlichen Wirkung, nicht erhöht wie bei den thyreoidektomierten Ratten.

Behandlung	Hirngew. g	AChE-Aktiv.am 3. Tag nach DFP pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	AChE-Aktiv.am lo. Tag nach DFP pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
Favistan 8x5o mg/kg oral+ DFP	1.45±o.13	165±17	239			4
Favistan 16x5o mg/kg oral + DFP	1.45±o.11			356±13	516	lo
Favistan 16x5o mg/kg oral	1.44±o.12			635±14	914	6

Tabelle 14: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns weiblicher E3-Ratten (loo g), die mit Favistan und DFP (1.5 mg/kg s.c.) und nur mit Favistan behandelt wurden.

Die dazugehörigen Kontrollwerte siehe Tabelle 15

Gruppe	Behandlung	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
I	Favistan-loo mg/kg oral	1.44±o.o18	672±18	968	5
	unbehandelte Kontrollen	1.44±o.o12	648±26	933	4
			am lo. Tag nach DFP		
II	Favistan + DFP loo mg/kg oral	1.42±o.o25	331±12	47o	6
	DFP	1.5o±o.o29	351±16	527	5

Tabelle 15: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns junger E3-Ratten (loo g) nach Vorbehandlung mit Favistan loo mg/kg oral und nach Applikation von 1.5 mg/kg DFP s.c. im Vergleich zu Kontrolltieren.

d) Schilddrüsenhormon

Nachfolgende Versuche sollten nun zeigen, ob bei alten Tieren der Anstieg der Enzymaktivität nach der DFP-Vergiftung durch Schilddrüsenhormon erhöht wird. Benutzt wurden L- und d-Trijodthyronin+ in verschiedener Dosierung.

Nach 2.o mg/kg d-Trijodthyronin täglich s.c. starben bis zum 6. Tag 13 von 28, d.h. ca. 45 % der Tiere zwischen 32o und 37o g Gewicht, was einem Alter von 12 bis 14 Monaten entspricht. Die durchschnittliche Gewichtsabnahme betrug

+L- und d-Trijodthyronin verdanke ich einer freundlichen Zuwendung durch die Fa. Farbwerke Höchst AG. in Höchst bei Frankfurt-M.

bis dahin 55 g. Die 15 überlebenden Tiere erhielten dann 1.25 mg/kg DFP s.c.. Im Laufe von 3 Stunden waren alle tot, wogegen von den nicht mit d-Trijodthyronin behandelten Kontrollen der gleichen Gewichtsklasse nur 5o % durch die gleiche Dosis DFP getötet wurden. Daraufhin wurde die tägliche Dosis bei einer Gruppe auf o.2 mg/kg d-Trijodthyronin herabgesetzt. Nach 6 Tagen hatten beide Gruppen ca. 1o % des Körpergewichtes verloren, aber vollzählig überlebt. Sie bekamen wiederum 1.25 mg/kg DFP s.c., was bei den mit L-Trijodthyronin behandelten in der ersten Stunde 13 von 24 Tieren und im Laufe von 48 Stunden weitere 9 Tiere tötete. Bei der mit der d-Form behandelten Gruppe lauten die entsprechenden Zahlen 5 und 12 von 23. In beiden Gruppen war die Empfindlichkeit gegen DFP erheblich verstärkt worden. Durch die physiologische L-Form allerdings mehr als durch die in der Natur nicht vorkommende d-Form.

Die Cholinesteraseaktivität wurde bei den Überlebenden am 1o. Tag nach der Vergiftung bestimmt. Die Hormonbehandlung war bis dahin weiter durchgeführt worden. Bei den Tieren unterschieden sich die Enzymkonzentrationen nicht von denen der unbehandelten Kontrollen.

e) Adrenalektomie

Von den Steroid-Hormonen wurden die Nebennierenrindenhormone und das männliche Geschlechtshormon geprüft.-
Die erste Versuchsserie wurde an jungen Ratten durchgeführt, denen die Nebennieren operativ entfernt worden waren. Die Tiere bekamen zur Ergänzung der Natrium-Bilanz physiologische Kochsalzlösung an Stelle von Trinkwasser. 12 bis

13 Tage nach der Adrenalektomie war bei sonst nicht behandelten Tieren wie Tabelle 16 zeigt, keine Veränderung der Cholinesteraseaktivität des Gehirns eingetreten.

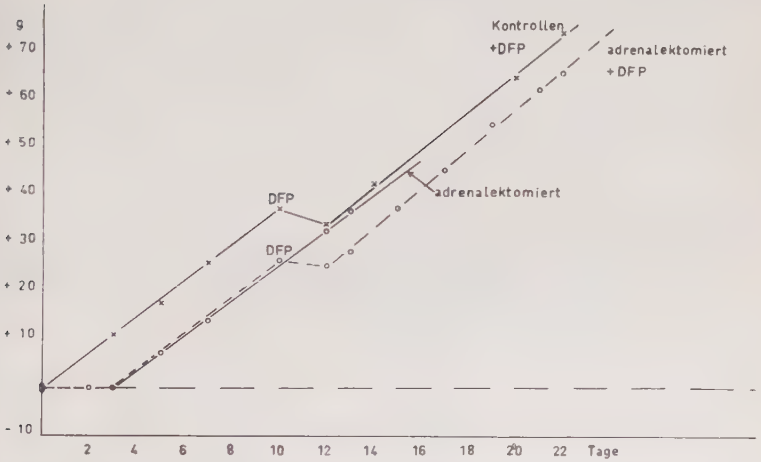
Behandlung	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
adrenalekt. Tiere	1.49±o.o2	652±16.6	972	7
Kontrollen	1.48±o.o1	658±37	975	4

Tabelle 16: Aktivität der Cholinesterase im Gehirn unvergifteter adrenalektomierter E3-Ratten (1oo g) am 12. bzw. 13. Tag nach der Operation und unbehandelter Kontrolltiere.

Bei den 12 überlebenden Tieren wurde am 2., 1o. und 11. Tag nach der DFP-Vergiftung die Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn gemessen. Die in der Tabelle 17 aufgeführten Versuchsergebnisse zeigen, daß zwischen den vergifteten operierten und nicht operierten Tieren kein Unterschied im Wiederanstieg der Hirnesterase besteht. Der Verlust der Nebennierenhormone hat folglich keinen Einfluß auf die Synthesegeschwindigkeit des Enzyms nach der Alkylphosphatvergiftung.

Aus der Abb. 7 ist zu erkennen, daß die Operation zu einem vorübergehenden Stillstand des Wachstums für 2 bis 3 Tage führt. Danach wachsen die operierten Tiere mit der gleichen Rate wie die nicht operierten Kontrolltiere. Der Gewichtsabfall nach der DFP-Injektion ist bei beiden Tiergruppen etwa gleich, und genau so verlaufen auch die Wachstumskurven in den folgenden Tagen parallel. Zwischen beiden Gruppen bleibt die durch die Operation hervorgerufene Gewichtsdif-

ferenz bis zum Versuchsende völlig konstant. Der Entzug der Nebennierenhormone hatte somit weder einen Einfluß auf die normale Enzymkonzentration noch auf die Synthesegeschwindigkeit nach DFP-Vergiftung.



Gewichtszunahme bei adrenalektomierten Ratten (100 g) und Kontrolltieren, die z Teil mit 1,5 mg/kg DFP s.c. vergiftet wurden. Jeder Punkt der Kurve zeigt das Durchschnittsgewicht von mindestens 3 Tieren an. 0=Tag der Operation und Versuchsbeginn

Abb. 7

Behandlung	Hirngew. g	unter-sucht am	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
adrenalekt. Tiere	1.44±o.12	2. Tag nach DFP	14o± 7.4	2o2	4
Kontrollen	1.44±o.o6		14o± 2.7	2o2	3
adrenalekt. Tiere	1.5 ±o.o9	lo. Tag nach DFP	36o±18.9	54o	4
Kontrollen	1.5 ±o.o8		355± 7.7	533	2
adrenalekt. Tiere	1.48±o.o6	11. Tag nach DFP	386±15.9	572	4

Tabelle 17: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn, der mit 1.5 mg/kg s.c. DFP vergifteten adrenalektomierten E3-Ratten (loo g) und der vergifteten Kontrolltiere (loo g).

f) DOCA

Es war nun zu prüfen, ob die Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn durch die Applikation von Nebennierenrindenhormonen beeinflußt wird. Als Vertreter der Halocortine wurde DOCA (Desoxycorticosteronazetat, Schering AG.) gewählt. An Stelle eines Glukocorticoids wurde das Adrenocorticotrope-Hormon des Hypophysenvorderlappens verwendet, das eine Hypertrophie der Nebennierenrinde und Mehrproduktion von Cortison hervorruft.

Innerhalb 19 Tagen erhielten alte weibliche Albino-Ratten, die über 2oo g schwer waren, nach einer Initialdosis von

lo mg/kg zehnmal 25 mg/kg DOCA i.p. in 1%iger Sesamöllösung. Am 5. Tag nach Versuchsbeginn erfolgte die Applikation von 1.25 mg/kg DFP s.c.. Am 3., 7., 13. und 14. Tag danach wurden die Tiere getötet und die Acetylcholinesterase im Gehirn gemessen (Tabelle 18).

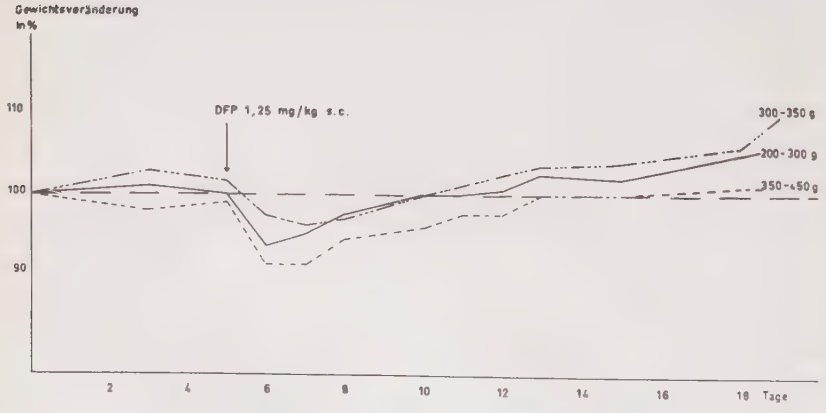
Behandlung	Körpergewicht g	Hirngew. g MW	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
			3. Tag nach DFP		
	3oo-35o	1.78	118	21o	1
			7. Tag nach DFP		
	2oo-25o		229		2
	25o-3oo		276		1
	3oo-35o		26o		1
	35o-45o		2o8		2
		1.66±o.o6	243±32	4o3	
DOCA + DFP			13. Tag nach DFP		
	2oo-25o		355		2
	25o-3oo		327		2
	3oo-35o		344		2
	35o-45o		3o5		1
		1.62±o.o5	332±22	537	
			14. Tag nach DFP		
	2oo-25o		362		3
	25o-3oo		356		2
	3oo-35o		335		2
	35o-45o		317		1
		1.67±o.o8	345±21	576	

Tabelle 18: Aktivität der Acetylcholinesterase des Gehirns alter Albino-Ratten (2oo - 45o g schwer), die mit 1.25 mg/kg DFP s.c. vergiftet waren und denen DOCA appliziert wurde. Die dazugehörigen DFP-Kontrollwerte stehen in Tabelle 2o.

Der Vergleich mit den Kontrollwerten aus Tabelle 2o zeigt, daß der Wiederanstieg der Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn DOCA-behandelter Versuchstiere mit der gleichen

Geschwindigkeit erfolgte wie bei den Kontrolltieren. Der Enzymumsatz im Gehirn wurde durch das Halocortin nicht beeinflußt.

In der Abb. 8 sind die während des Versuches vorgenommenen Gewichtskontrollen aufgezeichnet. Am 5. Tag nach DFP hatten die Versuchstiere, bis auf die Gruppe der 350-450 g schweren Tiere, ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht und nahmen bis zum Versuchsende noch 5 - 10 % an Gewicht zu. Diese Gewichtszunahme ist wahrscheinlich auf eine durch die großen Dosen DOCA hervorgerufene Ödembildung, infolge von Na-Retention, zurückzuführen.



Gewichtskontrolle alter weiblicher DFP-vergifteter Ratten während der Behandlung mit DOCA.

——— Tiere zwischen 200 - 300 g

——·—— Tiere zwischen 300 - 350 g

– – – – – – Tiere zwischen 350 - 450 g

Abb. 8

In der folgenden Tabelle 19 sind die Gewichte der Nebennieren einiger Versuchstiere verzeichnet.

Behandlung	durchschnittl. Gew. d. Nebennieren am 19. Versuchstag		Anzahl der Tiere
	Frischgew.	Trockengew.	
DFP + ACTH 2 x 5 m I.E./ 1oo s.c. g	47 mg	13.4 mg	6
DFP + DOCA 1 x1o mg/kg i.p. 1o x25 mg/kg i.p.	47.4mg	13.1 mg	7
DFP Kontrollen	4o mg	1o.9 mg	6
Kontrollen	3o.8mg	8.o mg	2o

Tabelle 19: Frisch- und Trockengewichte der Nebennieren alter DFP-vergifteter Albino-Ratten (2oo g), die mit ACTH und DOCA behandelt wurden.

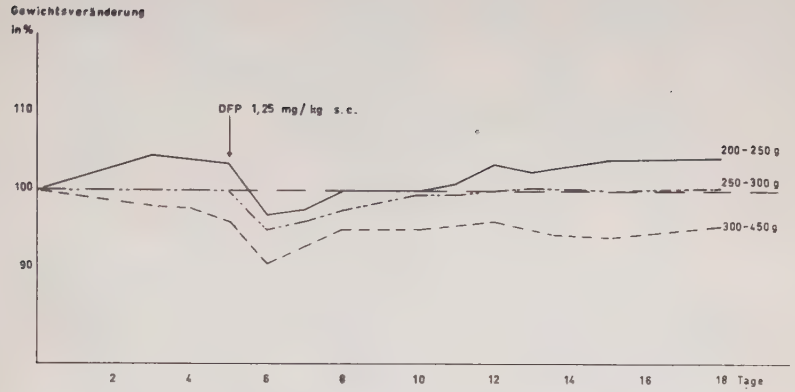
Das Feucht- sowie das Trockengewicht haben nach DOCA etwa genau so stark zugenommen wie nach ACTH. Dieser Befund steht im Widerspruch zu dem was bisher über den Einfluß von Corticosteroiden auf die Nebenniere bekannt ist. Möglicherweise wird ein Teil des von außen zugeführten DOCA bei der Ratte in 11-Stellung hydroxyliert (35). Das dadurch entstandene Corticosteron müßte erwartungsgemäß zu einer Atrophie der Nebennierenrinde führen. Bei gleichzeitiger Verabfolgung von DFP kam es nach DOCA jedoch zu einer Nebennierenrindenhypertrophie. Es wäre zu prüfen, ob DFP eine Hemmung der 11-Hydroxylierung von DOCA hervorruft.

g) ACTH

Die Experimente mit ACTH wurden ebenfalls an alten weiblichen Albino-Ratten im Gewicht zwischen 2oo und 4oo g durchgeführt. Die Tiere erhielten am 1. und 2. Tag je 5 m I.E./1oo g und an den folgenden Tagen je 1o m I.E./1oo g ACTH s.c.. Am 5. Tag nach Versuchsbeginn wurden 1.25 mg/kg DFP s.c. appliziert und nach 3, 7, 13 und 14 Tagen die Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn gemessen (Tabelle 2o).

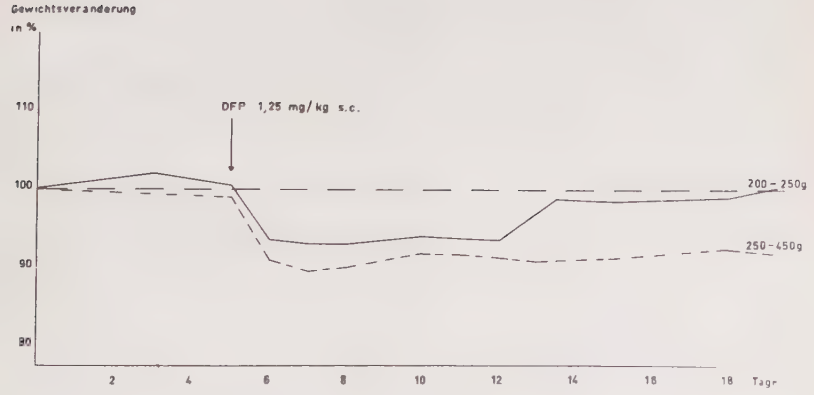
Die während des Versuches vorgenommenen Gewichtskontrollen sind in den Abb. 9 und 1o graphisch dargestellt. Nach der Injektion von DFP erfolgte eine Gewichtsabnahme der Versuchstiere. Die mit ACTH behandelten 2oo-3oo g schweren Tiere hatten bereits 5 Tage nach der Vergiftung ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht. Dagegen blieben die sehr alten Tiere, die 3oo-45o g wogen (Abb. 9) und die nicht mit ACTH behandelten (Abb. 1o) bis zum Ende des Versuches unter dem Ausgangsgewicht.

Da weder ACTH oder DOCA noch Adrenalektomie die Synthesegeschwindigkeit der Acetylcholinesterase beeinflussen, kann geschlossen werden, daß die Nebennierenrinde für die Synthese dieses Enzyms im Gehirn keine Bedeutung hat.



Gewichtskontrolle alter weiblicher DFP-vergifteter Ratten
während der Behandlung mit ACTH.
——— Tiere zwischen 200 - 250 g
— - — Tiere zwischen 250 - 300 g
— — — Tiere zwischen 300 - 450 g

Abb. 9



Gewichtskontrolle alter weiblicher DFP-vergifteter Ratten
——— Tiere zwischen 200 - 250 g
— — — Tiere zwischen 250 - 450 g

Behandlung	Körpergewicht g	Hirngew. g MW	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
DFP + tgl. ACTH	300-350	1.77	150	266	1
			3. Tag nach DFP		
	200-250	1.69±0.09	248±11		2
	250-300		243± 3		2
	300-350				
	350-450		228±11		2
			240±10	406	
			7. Tag nach DFP		
	200-250	1.67±0.05	346±18		3
	250-300		368± 5		2
	300-350		322±24		2
	350-450		334		1
			342±19	571	
			13. Tag nach DFP		
	200-250	1.67±0.08	390± 6		3
	250-300		341		1
	300-350		330		1
	350-450		338		1
			350±25	585	
			14. Tag nach DFP		
DFP	200-250	1.63±0.08	261±17		2
	250-300		241		1
	300-350		224		1
	350-450		230±14		2
			239±16	390	
			7. Tag nach DFP		
	200-250	1.74±0.06	370		1
	250-300		314		1
	300-350		346		1
	350-450		319±20		2
			337±25	586	
			13. Tag nach DFP		
	200-250	1.63±0.07	373±38		2
	250-300		337±30		2
	300-350		341		1
	350-450		312		1
			341±25	556	
			14. Tag nach DFP		

Tabelle 20: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn alter Albino-Ratten nach der Behandlung mit ACTH und Vergiftung mit 1.25 mg/kg DFP s.c.

h) Testosteron

Ganz analog verhielt es sich mit dem anabol wirkenden männlichen Keimdrüsenhormon. Dieses Steroid wurde als Depotpräparat verabreicht, das die Firma Schering AG. in Form des Önanth- und Propionsäureesters von Testosteron in den Handel bringt.+

Alte männliche und weibliche Albino-Ratten, im Gewicht über 28o g, erhielten 24 Std. nachdem sie mit 1.5mg/kg DFP s.c. vergiftet worden waren, je lo mg/kg und nach 2 Tagen noch einmal je 5 mg/kg Depot-Testoviron i.m. Am 8., 9., sowie lo. Tag nach der Vergiftung mit DFP wurde die Acetylcholinesteraseaktivität im Gehirn dieser Ratten gemessen. Wie Tabelle 21 zeigt, hatte die Behandlung mit Testosteron keinen Einfluß auf die Synthese der Gehirnacetylcholinesterase nach der Alkylphosphatvergiftung. Dabei liegen die Werte weiblicher Tiere jeweils etwas niedriger im Vergleich zu denen der männlichen Tiere. Diese Differenz ist aber statistisch nicht gesichert.

+Das Präparat Depot-Testoviron wurde mir unentgeltlich von der Herstellerfirma überlassen, wofür ich mich sehr bedanke.

Geschl. der Tiere	Hirngew. g	unters. am	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
♂ ♂ ♀ ♀		8.Tag nach DFP	269 27o 245 256		2 2 2 2
	1.72±o.o8		26o±12	448	
Kontrollen	1.77±o.o8		26o±1o	46o	2
♂ ♂ ♀ ♀		9.Tag nach DFP	329 332 284 266		2 2 2 2
	1.7o±o.o9		3o3±32	515	
Kontrollen	1.7o±o.o6		266± 6	453	4
♂ ♀		1o.Tag nach DFP	33o 285 277		2 2 2
	1.68±o.o2		297±28	5oo	
Kontrollen	1.63±o.o6		299±28	488	2

Tabelle 21: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn alter Albino-Ratten (über 28o g schwer) nach der Vergiftung mit 1.5 mg/kg DFP s.c. und Behandlung mit Depot-Testosteron.

i) Insulin

Der Einfluß von Insulin auf den Umsatz der Cholinesterase im Gehirn vergifteter Tiere wurde mit käuflichem Depot-Insulin der Firma Hoechst AG. geprüft.

Insulin ruft eine Hypoglykämie hervor, die so stark werden kann, daß Krämpfe ausgelöst werden. In vitro Versuche von Mann, Tennenbaum u. Quastel (36) ergaben bei erniedrigter Glucosekonzentration auf 1o mg% eine stärkere Bildung von Acetylcholin als bei 1oo mg% Glucose. Feldberg (37) hat

diesen Befund für die Deutung der Krampfwirkung des Insulins herangezogen. Jedoch ist bisher weder nachgewiesen, daß die Acetylcholinkonzentration im Gehirn durch Insulin erhöht wird, noch hat sich zeigen lassen, daß eine Erhöhung der Acetylcholinkonzentration Krämpfe auslöst. In einer sorgfältigen Studie fanden Herken und Neubert (38) bei verschiedenartig ausgelösten Krämpfen keine Änderung und gerade in der Narkose einen Anstieg der Acetylcholinkonzentration im Rattenhirn.

Für die in dieser Arbeit behandelte Frage waren Befunde ausschlaggebend, die an Bakterienkulturen erhoben wurden. Zucker hemmt auf ziemlich unspezifische Weise die Synthese einer Reihe verschiedenartiger Enzyme, wie Stephenson und Yudkin (39) und später auch Gale (4o) feststellten. Somit wäre auch beim Warmblüter ein Einfluß der Blutzuckerkonzentration auf die Enzymsynthese denkbar.

Alte Ratten wurden mit 1.5 mg/kg DFP s.c. vergiftet und vom nächsten Tag an täglich einmal mit verschieden hohen Dosen Depot-Insulin (Hoechst) behandelt. Auch hier wurde durch Messungen am 2., 4., 8., 9. und lo. Tag nach der Alkylphosphatvergiftung der Wiederanstieg der Hirnesterase verfolgt und die ermittelten Werte mit den dazugehörigen Kontrollwerten verglichen (Tabelle 22). Die Applikation von Insulin an alte alkylphosphatvergiftete Albino-Ratten hatte keinen Einfluß auf die Fermentsynthese im Gehirn. Die Acetylcholinesteraseaktivität stieg bei den behandelten Tieren mit der gleichen Geschwindigkeit an wie bei den Kontrollen.

vorbehandelt mit Insulin I.E./kg s.c.	unter-sucht Tage nach DFP	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
1 x o.4	2	1.853	85	158	1
1 x o.3 1 x o.2	4	2.o67	114	232	1
6 x o.2	8	1.69±o.o4	279 244 29o 271±24	458	6
	8	1.77±o.o8	26o±1o	46o	2
1 x o.4 5 x o.2	9	1.76±o.o6	3o5 266 285±28	5o3	4
	9	1.7o±o.o6	266± 6	453	4
1 x o.4 6 x o.2	1o	1.7o±o.o6	31o 31o 283 27o 293±2o	498	8
	1o	1.63±o.o6	299±28	488	2

Tabelle 22: Aktivität der Acetylcholinesterase alter Albino-Ratten (über 28o g schwer) nach der Vergiftung mit 1.5 mg/kg DFP s.c. und Behandlung mit Insulin.

4) CFT 12o1

In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob das Phenylessigsäurederivat CFT 12o1+ einen Einfluß auf den normalen Enzymumsatz im Gehirn oder auf die Synthesegeschwindigkeit nach DFP-Vergiftung hat.

+Die Verbindung CFT 12o1 wurde von Herrn Dr. Pflugk (Chem. Fabrik Tempelhof) synthetisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

CFT 12o1 (Phenyl- diallyl- essigsäure- diäthyl- amino- äthanolester) und andere Phenylessigsäurederivate wie z.B. SKF 525 A (Diphenyl- propyl- essigsäure- diäthyl- amino- äthanolester) hemmen die enzymatische Oxydation vieler Arzneistoffe, die in der Mikrosomenfraktion der Leberzellen vor sich geht (41 - 42). Falls die Oxydationsprodukte pharmakologisch unwirsam sind, was häufig vorkommt, läßt sich die Enzymhemmung an einer Wirkungsverlängerung und Wirkungsverstärkung der in Frage kommenden Pharmaka ablesen. Über die ersten derartigen Beobachtungen mit CFT 12o1 haben Neubert und Herken (43) berichtet, die mit Hilfe verschiedener Schlafmittel, Cardiazol, d-Tubocurarin und Succinylbischolin versucht haben, die Art der gestörten chemischen Reaktion zu charakterisieren. Etwas früher hatten Cook, Toner und Fellows (44) die Verlängerung der Hexobarbitalwirkung durch SKF 525 A beschrieben.

Bekanntlich entstammen die als Mikrosomen bezeichneten Teilchen dem endoplasmatischen Reticulum, das in der Nachbarschaft des Zellkernes zu finden ist und das die Ribosomen trägt, die für die Proteinsynthese von entscheidender Bedeutung sind (45 - 46).

Neubert und Timmler (47) haben nachgewiesen, daß CFT 12o1 den Einbau von 1-C^{14}-dl-Alanin in die Mikrosomenproteine der Leber hemmt. So war es naheliegend, den Einfluß dieses Hemmstoffes auf die Enzymsynthese im ZNS zu prüfen.

loo g schwere Ratten erhielten täglich loo mg/kg CFT 12o1 oral. Am lo. Tag bekam ein Teil je 1.5 mg/kg DFP s.c.

Am 21. Tag wurde die Acetylcholinesteraseaktivität gemessen. Die in Tabelle 23 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß der angewandte Hemmstoff CFT 12o1 die hier geprüfte Enzymsynthese im Zentralnervensystem nicht beeinflußt.

Behandlung	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
CFT 12o1+DFP	1.48±o.13	35o±12	518	1o
DFP	1.44±o.o5	355±1o	511	5
CFT 12o1	1.42±o.o7	643± 7	914	4
	1.44±o.o3	655±18	943	1o

Tabelle 23: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn junger DFP-vergifteter E3-Ratten (1oo g), die mit CFT 12o1 behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollwerten nur DFP-vergifteter Tiere. Außerdem sinddie Werte für unbehandelte Tiere und solcher, die 21 Tage lang nur CFT 12o1 erhielten, verzeichnet.

5) Einfluß des Funktionszustandes des Zentralnervensystems. Applikation erregender Substanzen.

a) Pervitin

Die anschließend durchgeführten Versuche sollten klären, ob der Funktionszustand des Zentralnervensystems eine Bedeutung für die Synthesegeschwindigkeit der Cholinesterase hat.

Die Frage, ob der Funktionszustand des Zentralnervensystems die Proteinsynthese beeinflußt, wurde bereits von Vladi-

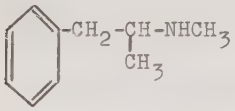
mirov (48) sowie von Gaitonde und Richter (49) mit Hilfe radioaktiv markierter Aminosäuren bearbeitet. Vladimirov fand den Einbau von markiertem Methionin und markiertem Glycin in das Gehirnprotein nach elektrischer Reizung der Ratten erhöht. Gaitonde und Richter sahen dagegen während des Elektrokrampfes eine gewisse Erniedrigung der Einbaurate von markiertem Methionin in die Gehirnproteine.

Bei derartigen Kurzzeitversuchen hat sicher schon eine Veränderung der Durchblutung des Gehirns einen wesentlichen Einfluß auf die Einbauquote, denn von der Durchblutung hängt das Angebot der markierten Aminosäure ab. So lassen sich die konträren Ergebnisse vielleicht erklären. Die Differenz könnte jedoch auch durch Altersunterschiede zwischen den von den beiden Untersuchern verwendeten Ratten hervorgerufen sein.

In den eigenen Versuchen, die sich über mehrere Tage erstrechten, wurde zunächst nur mit erregend wirkenden Arzneistoffen versucht, die Funktion des Zentralnervensystems zu verändern. Bei chronischen Experimenten mit sedativ oder narkotisch wirkenden Stoffen, ergeben sich Schwierigkeiten, weil die Tiere nach kurzer Zeit nur noch wenig oder gar nicht fressen und sich auch nicht mehr putzen. Dadurch kommen sie in einen so schlechten Zustand, daß eine Auswertung der Ergebnisse sehr erschwert ist.

Als erstes wurde das zentral erregende Methamphetamin (Pervitin) verwendet, das zwar auch eine Verminderung der Fresslust hervorrufen soll, die jedoch niemals zu so bedrohlichen Gewichtsverlusten geführt hat, daß eine dadurch

bedingte Einschränkung der Enzymsynthese befürchtet werden müßte. Wie die anfänglich geschilderten Versuche gelehrt haben, ist der Einfluß der Nahrungszufuhr auf diesen Prozeß ohnehin gering.



Methamphetamin (Pervitin)

Die Experimente wurden an alten Albino-Ratten im Gewicht über 28o g, die mit 1.5 mg/kg DFP s.c. vergiftet worden waren, durchgeführt. Nach 24 Stunden erhielten die überlebenden Tiere täglich 5 mg/kg Methamphetamin s.c.. In der Tabelle 24 sind die bis zum Tag der Untersuchung injizierten Mengen Pervitin, die gemessene Hirnacetylcholinesteraseaktivität, die Hirngewichte und die Anzahl der Versuchstiere verzeichnet.

Die durchschnittliche Gewichtsabnahme im Laufe von 8 Tagen betrug bei den Kontrolltieren 5 g und bei den mit Pervitin behandelten 18 g, also etwa das 3.5fache.

Obwohl bei den mit Methamphetamin behandelten Tieren eine sehr starke Ausgangshemmung eingetreten war, liegen die Werte der behandelten Ratten an allen 3 Untersuchungstagen höher als bei den Kontrollen. Das eingesetzte Tiermaterial reicht selbstverständlich nicht für eine endgültige Aussage darüber aus, ob die Synthese der Cholinesterase durch Pervitin beschleunigt wird oder nicht. - Aber die Experimente könnten im Zusammenhang mit den folgenden Versuchen, die mit anderen erregenden Stoffen durchgeführt wurden, vielleicht besser gedeutet werden.

behandelt mit Pervitin mg/kg s.c.	unter-sucht Tage nach DFP	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anz. der Tiere
1 x 5.o	1	1.76±o.12	64·	113	2
2 x 5.o	2	1.79±o.o6	98±13	175	2
6 x 5.o	8	1.66±o.o6	274±11	455	3
Kontrollen	8	1.77±o.o8	26o±1o	46o	4
7 x 5.o	9	1.67±o.o4	3o9±14	516	3
Kontrollen	9	1.7o±o.o6	266± 6	453	2
8 x 5.o	1o	1.64±o.o5	323±35	53o	2
Kontrollen	1o	1.63±o.o6	299±28	488	2

Tabelle 24: Aktivität der Cholinesterase des Gehirns alter Albino-Ratten (28o g schwer) nach der Vergiftung mit je 1.5 mg/kg DFP s.c. und anschließend täglicher Behandlung mit Pervitin.

b) Kampfer

Wegen der nur kurze Zeit andauernden Wirkung eignet sich das Pervitin für diese Versuche sicher nicht besonders gut. Jedoch sind erregende Pharmaka mit langanhaltender Wirkung kaum bekannt. Diesem Erfordernis hätte der aus der therapeutischen Anwendung fast verschwundene Kampfer vielleicht am ehesten entsprechen können. Aus der öligen Lösung wird der schlecht wasserlösliche Kampfer nur langsam resorbiert, so daß die i.m. Injektion zu einer gewissen Depotwirkung führt. Die Dosis von 5oo mg/kg in 1o%iger öliger Lösung erschien aufgrund der Vorversuche geeignet, für mehrere Stunden einen Erregungszustand herbei-

zuführen, der von klonischen Muskelzuckungen begleitet war, aber nicht zum Tode führte. Selbst das Doppelte dieser Dosis, 1 g/kg, wurde von allen Tieren überlebt.

Der Versuch wurde mit 7 alten (>25o g) und 8 jungen Ratten (im Mittel 11o g) durchgeführt. Die alten Tiere bekamen 1.75 mg/kg DFP s.c., die jungen 2.o mg/kg DFP s.c.. 24 Stunden danach wurden 5oo mg/kg Kampfer zu 1o % in Öl gelöst i.m. injiziert. Von den 7 alten Tieren starben im Laufe von 1o Stunden 3, während alle jungen überlebten. Bei den alten Tieren liegt also eine erhöhte Empfindlichkeit für Kampfer infolge der DFP-Vorbehandlung vor. An den folgenden Tagen wurde die gleiche Dosis von den überlebenden ohne weiteres vertragen. Die Kampferinjektion wurde weiterhin einmal täglich durchgeführt. Die Gruppe der alten Tiere wurde am 9. und 1o. Tag getötet, die der jungen am 8. und 13. Tag. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Messungen aufgeführt. Bei den jungen Tieren war zwischen den nicht mit Kampfer behandelten Kontrollen und der mit Kampfer behandelten Versuchsgruppe kein Unterschied festzustellen. Dagegen zeigten die älteren Tiere der mit Kampfer behandelten Gruppe an beiden Untersuchungstagen etwas höhere Werte, die sich jedoch ähnlich wie im Pervitinversuch mit statistischen Rechenmethoden nicht als reale Abweichungen festlegen ließen.

Behandlung	Tage nach DFP	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
Kampfer+DFP	8	1.47±0.09	298± 7	438	3
DFP	8	1.52±0.05	299	454	2
Kampfer+DFP	13	1.50±0.03	405±11	607	5
DFP	13	1.49±0.09	401±27	600	2
			junge Tiere (110 g)		
Kampfer+DFP	9	1.69±0.08	294±20	497	2
DFP	9	1.68±0.02	270±14	453	2
Kampfer+DFP	10	1.65±0.09	306±18	505	2
DFP	10	1.66±0.09	294± 8	488	2
			alte Tiere (250 g)		

Tabelle 25: Aktivität der Cholinesterase des Gehirns junger und alter mit 2.0 bzw. 1.75 mg/kg DFP i.m. vergifteter Albino-Ratten, denen täglich je 500 mg/kg Kampfer zusätzlich appliziert worden war.

c) Cardiazol und Coffein

Daraufhin wurden weitere Versuche mit den zentralerregenden Substanzen Cardiazol und Coffein durchgeführt. Wie in den Experimenten mit Kampfer kam es auch jetzt darauf an, die Tiere in einen möglichst lange anhaltenden Erregungszustand zu versetzen. Zu diesem Zweck bekamen die Ratten als Trinkwasser eine 10%ige Cardiazollösung bzw. eine 5%ige Lösung mit Coffein. natr. citric. und ein mit einer 10%igen Cardiazollösung bzw. mit einer 5%igen Lösung von Coffein. natr. citric. getränktes normales Futter. Eine andere Versuchsgruppe dagegen erhielt für 17 Tage 2 x täglich 30 bzw. 50 mg/kg Cardiazol s.c. in wässriger Lösung.

In den Tabellen 26, 27 und 28 sind die Messergebnisse verzeichnet.

Für den 1. Versuch (Tabelle 26) wurden alte Ratten (>25o g) mit 1.5 mg/kg DFP s.c. vergiftet. 4 Stunden danach bekamen die Tiere einmal 8o mg/kg s.c.Cardiazol als Initialdosis und wurden dann für 19 Tage nur mit cardiazol- oder coffeinhaltigem Futter und Trinkwasser versorgt. Am 12., 18. und 19. Tag nach der Vergiftung mit DFP wurde bei den Versuchstieren die Cholinesteraseaktivität im Gehirn gemessen. Die Ergebnisse dieses Versuches waren nicht eindeutig. Besonders am 12. Tag waren die Werte in den beiden mit Coffein bzw. Cardiazol behandelten Gruppen erheblich höher als bei den Kontrollen. Jedoch waren hier zu wenig Tiere eingesetzt, so daß eine Wiederholung des Versuches notwendig erschien.

Die in Tabelle 27 aufgeführten Werte lassen erkennen, daß Cardiazol im Futter und im Trinkwasser verabfolgt, bei den Versuchstieren zu keiner Beschleunigung der Cholinesterasesynthese im Gehirn führt. Auch bei unvergifteten Ratten hatte die beschriebene Applikation von Cardiazol oder Coffein keinen Effekt auf die Konzentration der Cholinesterase (Tabelle 28).

In dem letzten mit Cardiazol durchgeführten Experiment wurde die Substanz täglich s.c. in wässriger Lösung appliziert. Die in Tabelle 29 aufgeführten Messergebnisse der unvergifteten nur mit Cardiazol behandelten Tiere unterschieden sich nicht von denen der unbehandelten Kontrollen. Die Konzentration der Cholinesteraseaktivität im Gehirn

beider Versuchsgruppen war gleich groß. Bei den mit DFP-vergifteten Ratten führte die Behandlung mit Cardiazol zu einer geringen Steigerung der Synthesegeschwindigkeit, obwohl auch hier die Differenz zu den Kontrollen bei der Anwendung statistischer Rechenmethoden als nicht gesichert angesehen werden muß (Tabelle 29).

Die erregend wirkenden Pharmaka führten nur bei den alten Tieren zu einer geringgradigen Steigerung der Synthese von Acetylcholinesterase im Gehirn. Da die Differenzen gegenüber den Kontrollen sich als statistisch nicht signifikant erwiesen, hätte jeder der Versuche für sich allein betrachtet zu der Schlußfolgerung geführt, daß erregende Pharmaka keinen Einfluß auf die Synthesegeschwindigkeit ausüben. So geringfügig die Steigerung auch ist, sie tritt sehr einheitlich nach Pervitin, nach Kampfer und nach Cardiazol auf. Eine auf einer Streuung beruhende Differenz hätte sich bei der ziemlich großen Zahl von Einzelmessungen auch einmal nach der entgegengesetzten Richtung auswirken müssen. Somit ist immerhin mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß erhöhte Erregung des Zentralnervensystems zur gesteigerten Synthese von Acetylcholinesterase führt.

unter-sucht Tage nach DFP	Gewichts-abnahme g	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
12	5	1.8o	237	427	1
18	5	1.59	341	543	1
19		1.9o	368	7oo	1
			1. Kontrollen		
12	25	1.63	311	5o7	1
18	8o	1.83	34o	622	1
19	85	1.83±o.o4	387±18	7o8	2
			2. Cardiazolfutter		
12	15	1.73	286	495	1
18	25	1.72	3o4	523	1
19	85	1.66	382	634	1
			3. Coffeinfutter		

Tabelle 26: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn mit 1.5 mg/kg DFP s.c. vergifteter alter Ratten (⌀ 28o g), nach Verfütterung von Standardfutter, cardiazol- oder coffeinhaltigem Futter und Trinkwasser.

unter-sucht Tage nach DFP	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Gewichts-änderung g	Anzahl der Tiere
5	1.23	368	453	+1o	1
6	1.37	394	54o	+22	2
7	1.42±o.12	4o1±26	57o	+22	6
9	1.66	347	575	+15	1
		a) Standardfutter - Kontrollen			
1	1.49	74	11o		1
5	1.24	368	457	-1o	1
6	1.24	422	523	-1o	1
7	1.34±o.11	396±2o	53o	-2o	5
		b) Cardiazolfutter			
		Junge Tiere (6o bis 95 g schwer) 1.75 mg/kg DFP s.c.			
2.5Std.	1.87	24.5	45.8		1
1	1.73	1o3.5	179		1
2	1.75	14o	245		2
5	1.75	226	395		2
6	1.66	256	425		2
1o	1.68	322	542		1
		a) Standardfutter - Kontrollen			
5	1.9o	225	428	-3o	2
6	1.82	247	45o	-35	2
9	1.76±o.13	299±12	527	-5o	4
1o	1.66±o.11	312±16	518	-5o	4
		b) Cardiazolfutter			
		Alte Tiere (über 28o g schwer) 1.5 mg/kg DFP s.c.			

Tabelle 27: Aktivität der Cholinesterase im Gehirn DFP-vergifteter junger und alter Albino-Ratten, die mit Standardfutter oder Cardiazolfutter ernährt wurden.

unter-sucht Tage nach Versuchs-beginn	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Gewichts-abnahme g	Anzahl der Tiere
5		678		55	1
1o		648		41	1
11		615		95	1
13		632		7o	1
	1.54±o.o4	643±26	99o		
		1. Cardiazolfutter			
5		681		55	1
1o		677		2o	1
11		637		35	1
13		66o		5o	1
	1.59±o.o5	663±2o	1o5o		
		2. Coffeinfutter			
	1.48±o.o7	664±21	983		1o
		3. Kontrollen			

Tabelle 28: Aktivität der Acetylcholinesterase im Gehirn von Albino-Ratten (15o g schwer), die mit Standardfutter, Cardiazol oder Coffeinfutter ernährt wurden.

Versuchs-dauer bzw. Tage nach DFP	Hirngew. g	AChE-Aktivität in µMol pro g u. Std.	pro Hirn u. Std.	Anzahl der Tiere
	1.8o±o.12	553±22	995	16
		1. unbehandelte alte Kontrolltiere		
1o	1.73±o.o9	551±21	953	4
17	1.7o±o.12	569±15	968	4
		2. mit Cardiazol behandelte alte Tiere		
		Die Ratten erhielten bis zum 11.Tag 2 x täglich 3o mg/kg s.c. und anschließend bis zum 17. Tag 2 x 5omg/kg s.c. Cardiazol		
2	1.78±o.13	86± 4	153	5
17	1.74±o.12	348±17	6o5	5
		3. mit 1.4 mg/kg DFP s.c. behandelte alte Tiere		
2	1.85±o.o7	77± 5	142	3
1o	1.7o±o.o2	275± 2	467	2
15	1.62	329	534	1
18	1.69±o.o8	387±14	653	4
		4. mit 1.4 mg/kg DFP s.c. und Cardiazol behandelte alte Tiere		
		Die Ratten erhielten die gleichen Cardiazol-Dosen wie die 2. Gruppe		

Tabelle 29: Aktivität der Cholinesterase des Gehirns DFP-vergifteter und unvergifteter Albino-Ratten (über 28o g schwer), denen Cardiazol s.c. injiziert wurde.

Diskussion

In den vorstehend beschriebenen Versuchen fällt die außerordentliche Konstanz der Cholinesteraseaktivität des Rattengehirns besonders auf. Bei der Bestimmung der Normalwerte beträgt die Standardabweichung 2 - 4 %. Diese geringe Streuung stimmt mit der Größenordnung der Fehlerbreite der Meßmethode überein, so daß mit einer äußerst geringen biologischen Varation gerechnet werden muß. Damit stellt sich die Frage nach den Regulationsmechanismen, die dafür sorgen, daß Synthese und Abbau dieses Enzyms im Zentralnervensystem so vollendet aufeinander ab estimmt sind.

Obwohl die Schritte der Proteinsynthese in großen Zügen bekannt sind, fehlen noch viele Kenntnisse über manche Einzelheiten. Im Plasma der Zelle befinden sich für jede Aminosäure spezifische Fermente, die die Reaktion zwischen den Carboxylgruppen der Aminosäuren und ATP katalysieren. Unter Abspaltung von Pyrophosphat entsteht ein gemischtes Anhydryd mit dem Phosphatrest von AMP, die aktivierte Aminosäure. Das hohe Übertragungspotenzial dieser Verbindung ermöglicht den Übergang in eine Esterbindung mit einer der freien alkoholischen Hydroxylgruppen an der Ribose eines endständigen Adenosylrestes, der Bestandteil einer löslichen Ribonucleinsäure ist. Diese löslichen Ribonucleinsäuren, deren Molekulargewicht etwa 3o.ooo beträgt, finden sich als sogenannte Träger-Ribonucleinsäuren ebenfalls im Zellplasma. Für jede in Frage kommende Aminosäure steht eine spezifisch strukturierte Träger-Ribonucleinsäure bereit, die die betreffende Aminosäure in die Ribosomen trägt und unter Anwesenheit von GTP als Coenzym die richtige Position an der

Ribonucleinsäurekette finden läßt. Auf noch ungeklärte Weise fördert außerdem Vitamin B_{12} den Einbau von Aminosäuren in die Proteine (5o). Das Vitamin soll in der für den Einbau erforderlichen, bei P_H 5.2 fällbaren Enzymfraktion des Zellplasmas zu finden sein (51). Hier erfolgt die Knüpfung der Peptitbindungen zum vollständigen Protein in einem Zuge. Intermediär treten keine peptitartigen Zwischenprodukte auf, wie man anfangs glaubte, sondern erst das fertige Eiweiß wird von der Nucleinsäure freigegeben. Der Code für die Aminosäuresequenz liegt in der Anordnung der Basen im Ribonucleinsäuremolekül, wobei die Kombination von jeweils 3 bis 4 Basen einer bestimmten Aminosäure entspricht. Wie die sekundäre und tertiäre Struktur entsteht, weiß man allerdings noch nicht. Die Sequenz bestimmt sicher manche Faltungen und H-Brückenbindungen und beeinflußt auf diese Weise die sekundäre Struktur. Aber das allein erklärt das gerade für Enzyme so bedeutungsvolle Zustandekommen der sekundären und tertiären Strukturmerkmale nicht.

Neben diesen für die Synthese aller Proteine notwendigen allgemeinen Faktoren spielen bei der Bildung spezifischer Enzyme oder bestimmter Organeiweiße noch andere Gesetzmäßigkeiten eine Rolle. In erster Linie ist dabei an die Wirkung von Hormonen zu denken. Bekanntlich fördert das Prolactin des Hypophysenvorderlappens nur die Milchproduktion, ACTH nur die Produktion der Glucocorticoide in der Nebennierenrinde und das Thyreotrope-Hormon lediglich die Eiweißsynthese in der Schilddrüse. Ähnliche organspezifische Wirkungen finden sich bei den Geschlechtshormonen und den ihre Synthese stimulierenden übergeordneten Hypo-

physen-Hormonen. Allerdings kommt noch hinzu, daß sie in der Pubertät die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale hervorrufen. Damit ist ja ein ganzer Komplex von Stoffwechselregulationen, Neubildungen und Wachstumsänderungen verknüpft, dessen einzelne Komponenten bisher bestenfalls descriptiv erfaßt werden können. Noch ist z.B. völlig unbekannt, auf welche Weise die geschlechtsspezifische Verteilung von Muskulatur und Fett zustande kommt oder wodurch die Entwicklung der Mammae beim Mädchen und das Wachstum des Kehlkopfes beim Jungen ausgelöst werden. Gut bekannt ist jedoch die anabole Wirkung des Testosterons, die sich vorwiegend an der Muskulatur abspielt. In letzter Zeit sind sogar Derivate des Testosterons synthetisiert worden, bei denen die androgene gegenüber der anabolen Wirkung ganz in den Hintergrund tritt.

Darüber hinaus kommen vielleicht auch Regulationsmechanismen beim Warmblüter in Frage, die bisher nur bei Mikroorganismen genauer untersucht wurden und als induktive Enzymbildung bzw. als Repression bezeichnet werden. Unter Induktion wird die Auslösung oder Verstärkung einer Enzymsynthese durch das Substrat des Enzyms oder eine chemisch nahe verwandte Substanz verstanden. Repression dagegen ist die Einschränkung der Enzymbildung durch das Endprodukt der fermentativen Reaktion. Dabei wird häufig ein gesamtes System derjenigen Enzyme betroffen, die an der Synthese des Endproduktes beteiligt sind. Der französische Biologe Monod (52) hat eine ganze Reihe experimenteller Anhaltspunkte beigebracht, wonach die Synthese jedes Enzyms von zwei Genen gesteuert wird. In dem einen Gen ist die Infor-

mation für die Proteinstruktur verankert, das andere führt zur Bildung eines Hemmstoffes, des Repressors der Synthese, Der Repressor wirkt sich außerhalb des Kernes auf die Fermentbildung aus. Bei mehreren Systemen, vor allem am Beispiel der Enzyme, die zur Tryptophansynthese notwendig sind, hat sich zeigen lassen, daß nicht das Endprodukt selbst repressorisch wirkt, sondern Ausgangsprodukt für die Bildung des Repressors ist. Nach dieser gut begründeten Anschauung kommt die induktive Fermentsynthese durch Stoffe zustande, die Antagonisten des Repressors sind. Derartige Funktionen haben häufig die Substrate oder deren Derivate. Gelegentlich kommen sie aber auch ganz anderen Verbindungen zu. Ob z.B. die Hemmung der Bildung einer ganzen Reihe von Fermenten durch manche Zucker, zu denen auch Glukose gehört, durch den gleichen Repressionsmechanismus bedingt oder ganz anderer Natur ist, konnte noch nicht entschieden werden.

Für die Aufrechterhaltung einer konstanten Fermentkonzentration in den Zellen ist selbstverständlich auch die Geschwindigkeit des Abbaues von Bedeutung. Im ausgewachsenen Organismus müssen Synthese und Abbau von Fermenten normalerweise mit gleicher Geschwindigkeit vor sich gehen. Aber über die Abbauvorgänge von Fermenten ist viel weniger bekannt als über die Synthese. Bisher wurde nur die Hydrolyse von Proteinen durch gewebseigene Fermente studiert. Lajtha fand ein Fermentsystem, das bei P_H 3.6 am wirksamsten war und ein zweites, dessen Optimum bei P_H 8 liegt. Das erstere ist unter O_2-Abschluß am wirksamsten, das zweite ist aerob stärker aktiv und soll ziemlich labil sein. Nach der Zellfraktionierung hydrolysieren die Mitochondrien mehr Eiweiß

als andere Zellbestandteile. Sicher stellt der Proteinabbau nicht einfach die Umkehr der Synthese dar, denn die letzten Schritte der Proteinbildung sind sehr wahrscheinlich irreversibel.

In eigenen Versuchen mit Hirnhomogenat in N_2-Atmosphäre bei 37^o trat im Laufe von 3 Tagen keine meßbare Verminderung oder Erhöhung der Cholinesteraseaktivität auf. Dabei war es gleichgültig, ob die verwendeten Tiere DFP bekommen hatten oder nicht. Die einzelnen Messungen sind aus der nebenstehenden Tabelle 3o zu ersehen. Als Konservierungsmittel zur Verhinderung von Bakterienwachstum war den Homogenaten Merthiolate 1:1o.ooo zugesetzt. Der P_H-Wert betrug 7.4. Sicher ist der O_2-Abschluß die Ursache dafür, daß keine Fermenthydrolyse stattgefunden hat oder die als labil bekannten Proteinasen wurden unter den gewählten Versuchsbedingungen rasch inaktiviert.

Der vorstehend beschriebene Unterschied des Aktivitätsanstiegs der Cholinesterase im Gehirn zwischen jungen und alten Ratten läßt sich z. Zt. noch nicht erklären. Man muß wohl annehmen, daß bei den jungen Tieren sowohl die Synthese als auch der Abbau schneller verlaufen als bei den alten. Faktoren der Ernährung oder der Blutversorgung dürften dabei kaum eine Bedeutung haben. Die Versuche, in denen beide Faktoren sehr krass geändert wurden, wirkten sich auf den Anstieg der Aktivität im Gehirn nach DFP überhaupt nicht aus. Offenbar ist die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen auch dann noch ausreichend für eine ungestörte Enzymsynthese, wenn an anderen Organen bereits er-

Tiere Gewicht g	Hirnesteraseaktivität in µMol ACh/g/Std.	
	sofort	nach 3 Tagen Inkubation bei 37°
7o	317	28o
75	291	
7o	269	248
7o	265	257
75	285	292
	MW 285 ± 2o	MW 27o ± 2o
		junge Tiere 1.2 mg/kg DFP s.c.
31o	132	127
28o	166	175
31o	168	155
28o	172	158
27o	14o	148
	MW 156 ± 17	MW 153 ± 17
		alte Tiere 1.2 mg/kg DFP s.c.
125	64o	612
165	61o	
15o	6o5	667
12o	6oo	
	MW 614 ± 18	MW 638
		unbehandelte Tiere

Tabelle 3o: Bestimmung der AChE-Aktivität im Hirnhomogenat DFP-vergifteter und unvergifteter E3-Ratten, das 3 Tage lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert wurde. Junge und alte E3-Ratten wurden mit je 1.2 mg/kg DFP s.c. vergiftet und 24 Stunden später dekapitiert.

hebliche Substanzverluste eintreten. Das Gehirn weist also im Vergleich zu anderen Organen ganz entscheidende Besonderheiten auf.

Von den untersuchten Hormonen haben STH, ACTH, Testosteron und Insulin an anderen Organen, zumindest auf den Gesamteiweißstoffwechsel nachweisbare Effekte. Den Stoffwechsel der Cholinesterase des Gehirns ließen sie völlig unbeeinflußt. Daneben ergibt sich aus den Versuchen mit Insulin gleichzeitig, daß die Höhe der Blutzuckerkonzentration für diese Synthese im Gehirn bedeutungslos ist.

Unerwartet war, daß sich die Förderung des aktiven Transportes von Aminosäuren durch STH hier gar nicht bemerkbar machte. Entweder ist die Permeaseaktivität im Gehirn optimal und kann darüber hinaus nicht gesteigert werden oder der Vorrat an Aminosäuren in den Zellen des Gehirns ist so groß, daß die Eiweißsynthese dadurch nicht limitiert wird.

Deutlich war die Beschleunigung des Aktivitätsanstiegs nach der zusätzlichen Applikation von Vitamin B_{12}. Man könnte spekulieren, ob bei alten Tieren ein relativer B_{12}-Mangel physiologisch ist. Das könnte durch verminderte Resorption oder geringere Speicherung bedingt sein und wäre zwar denkbar, ist aber experimentell nicht nachgewiesen. Jedoch ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß bei der typischen B_{12}-Mangelkrankheit des Menschen, der perniciösen Anämie, relativ frühzeitig Störungen am Zentralnervensystem beobachtet werden, die auf Behandlung mit Vitamin B_{12} gut ansprechen.

Die durch Thyreoidektomie beobachtete Verminderung der Synthese ist wahrscheinlich als Ausdruck der allgemeinen Beeinträchtigung des Stoffwechsels aufzufassen.

Der mit Eserin durchgeführte Versuch sollte zeigen, ob induktive Fermentbildung oder Repression für dieses Enzym im Gehirn Bedeutung haben. Das Ergebnis spricht dagegen, denn die Erhöhung der Fermentaktivität nach 3wöchiger Zufuhr von Eserin ist zu gering, um ein positives Ergebnis wahrscheinlich zu machen. E. Knox (55) hat als erster die adaptive Enzymbildung am Warmblüter untersucht. Er fand 5 - 7 Stunden nach der Gabe von 1 mg/kg L-Tryptophan oder einem Derivat einen 10fachen Anstieg der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber. In gleicher Weise fand sich eine durch Tyrosin induzierte Vermehrung der Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase in der Leber (56). Zwischen beiden Fermenten ergab sich bei der durch Substratzufuhr induzierten Enzymvermehrung jedoch ein grundsätzlicher Unterschied. Parallel zum Anstieg der Tryptophan-Pyrrolase ist der Einbau von markiertem Valin in die das Enzym enthaltende Fraktion der Leber im Vergleich zu anderen Proteinfraktionen erheblich erhöht. Dadurch ist nicht bewiesen, aber wahrscheinlich gemacht, daß die Erhöhung der Enzymaktivität durch Synthese bedingt ist. Bei der Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase ist diese Korrelation nicht feststellbar (57). Hier muß also ein anderer Mechanismus vorliegen. Vielleicht liegt das Enzym in einer inaktiven Vorstufe in der Zelle vor und braucht nur daraus freigesetzt werden.

An der Cholinesterase des Gehirns findet sich jedoch keine

Erhöhung der Enzymaktivität durch vermehrtes Substratangebot. Möglich wäre, daß die Substratkonzentration durch die Enzymhemmung mit Eserin nicht ausreichend ansteigt. Es könnte aber auch ein spezifisches Verhalten des Gehirns oder der Cholinesterase vorliegen. Darüber kann erst entschieden werden, wenn Versuche mit der Cholinesterase anderer Organe durchgeführt sind. Eine denkbare Erklärung ließe sich aus der besonderen Verteilung von Acetylcholin in der Zelle ableiten. Die Substanz ist nämlich nicht im Zellplasma direkt enthalten, sondern in besonderen Organellen, die als Bläschen bezeichnet werden. Diese Bläschen entleeren ihren Inhalt nach außen, wenn sie mit der Zellmembran in Kontakt geraten. Durch die Zellmembran vermag das stark geladene Molekül wahrscheinlich nicht zu penetrieren. Der physiologische Wirkort ist ebenfalls die Außenseite der Zellmembran. Hier findet sich der für die Funktion wichtige Anteil der Acetylcholinesterase. Dieser Anteil wird aus einem im Zellinneren gelegenen Enzymdepot ergänzt (58). Das Depot jedoch kommt mit dem Substrat nicht in Berührung und damit wäre verständlich, daß eine Induktion kaum stattfinden kann. Bei den Aminosäuren liegen die Verhältnisse viel einfacher, weil sie aktiv ins Zellplasma transportiert werden und geraten mit den dort vorhandenen Enzymen direkt in Kontakt.

Knox fand an den gleichen Leberenzymen auch eine Synthese stimulierende Wirkung von Cortison und ACTH. Die Aktivität stieg im gleichen zeitlichen Intervall wie bei der Induktion durch Substratangebot, aber das Ausmaß der Erhöhung betrug nur ein Drittel. Dieses Resultat war nicht zu erwarten, denn Cortison wirkt eher hemmend auf den Proteinstoff-

wechsel.

Die Versuche mit Eserin könnten auch der Gruppe der zentralerregenden Pharmaka zugefügt werden, denn es löst ebenfalls Erregungen des Zentralnervensystems aus. Die geringe Beschleunigung der Enzymbildung bei der Erregung läßt sich vielleicht als "Aktivitätshypertrophie" verstehen, womit über den Mechanismus selbstverständlich noch nichts ausgesagt ist. Es wäre auch möglich, daß eine Beeinflussung des Stoffwechsels der Ribonucleinsäure daran beteiligt ist. Coper, Herken und Koransky (53) haben bei Untersuchungen der energiereichen Nucleotide des Gehirns im Krampfanfall ein Verschwinden von säurelöslichen Adeninverbindungen beobachtet. Sie haben in der Diskussion ihrer Ergebnisse einen erhöhten Einbau in die RNS in Erwägung gezogen.

Das Experiment mit dem Phenylessigsäureester CFT 1201 wurde durchgeführt, weil die Verbindung bevorzugt auf Enzyme wirkt, die im Cytoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind und den Einbau von C^{14}-Alanin in die Mikrosomen hemmen. Auf die Aktivitätszunahme der Cholinesterase im Gehirn fand sich kein Effekt. Das steht nicht ohne weiteres im Widerspruch zu den Ergebnissen von Neubert und Timmler (54), denn der Einbau einer Aminosäure beweist noch nicht, daß Eiweiß synthetisiert wird. Neubert und Timmler könnten auch einen reinen Austauschvorgang gemessen haben.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Experimente stellen selbstverständlich nur einen Ausgangspunkt für weitere Analysen dar. Durch die Wahl geeigneter und gut definierter Be-

dingungen ergänzender in vitro Versuche kann die Interpretation sicher wesentlich erleichtert werden.

Zusammenfassung

Es wurde versucht, Anhaltspunkte für die Beeinflussung der Synthese von Acetylcholinesterase im Rattengehirn zu gewinnen. Die auf Enzymneubildung beruhende, mehrere Wochen dauernde Restitution des Fermentes nach der DFP-Vergiftung, wurde nach Einwirkung der verschiedensten Faktoren beobachtet. Als Maß für die Synthesegeschwindigkeit diente die mittlere Dauer der Hemmung und die sogenannte Halbwertzeit, errechnet aus den mit Hilfe der Warburg-Apparatur gewonnenen Meßergebnissen.

Ein Unterschied in der Synthesegeschwindigkeit besteht zwischen jungen und alten Tieren. Die jungen synthetisieren schneller. Durch Ernährungsfaktoren, wie Nahrungsentzug oder bestimmte einseitige Diät konnte die Synthese der Acetylcholinesterase nicht beeinflußt werden. Zu dem gleichen Ergebnis führte die Herabsetzung der Blutzufuhr des Gehirns durch Unterbinden der Carotiden.

Die Hormone STH, ACTH, Testosteron, Desoxycorticosteron und Insulin ließen den Stoffwechsel der Cholinesterase des Gehirns unbeeinflußt. Lediglich die zusätzliche Applikation von Vitamin B_{12} verursachte eine Beschleunigung des Aktivitätsanstiegs. Auch Thyreoidektomie und Adrenalektomie hatten keinen Einfluß auf den Umsatz des Enzyms im Gehirn.

Die aus dem mit Eserin durchgeführten Versuch gewonnenen Ergebnisse lassen erkennen, daß induktive Fermentbildung und Repression für die Acetylcholinesterase im Gehirn keine

Bedeutung haben.

Ebenso zeigte der Phenylessigsäureester CFT 12o1 keine Wirkung auf die Synthese von Acetylcholinesterase im Gehirn.

Dagegen führte die Applikation der erregend wirkenden Pharmaka Pervitin, Kampfer oder Cardiazol nur bei alten Tieren zu einer geringen Steigerung des Fermentumsatzes im Gehirn.

Für die Deutung der Ergebnisse werden die Kenntnisse über den Proteinstoffwechsel und die Steuerung der Enzymbildung herangezogen.

In vorbereitenden Experimenten wurde gefunden, daß das körpereigene Tetraamin Spermin als Reaktivator der mit Diaethylphosphaten gehemmten Acetylcholinesterase wirksam ist.

Literaturverzeichnis

1 Acs, G., Neidle, A., Waelsch, H.: Biochem. Biophys. Acta 5o, 4o3 (1961)

2 Aldridge, W.N.: Biochem. J. 54, 442 (1953)

3 Kewitz, H.: Kli. Wo. 35, 521-526 (1957)

4 Davison, A.N.: Biochem. J. 6o, 339 (1955)

5 Hydén, H.: Acta Physiol. Scand. 6. Suppl. 17 (1943)

6 Friedberg, F., Tarver, H. und Greenberg, D.M.: J. Biol. Chem., 173, 355 (1948)

7 Waelsch, H.: Metabolism of the Nervous System. D. Richter, S. 431 ff. London 1957

8 Lajtha, A., Fürst, S. und Waelsch, H.: Experientea 13, 168 (1957)

9 Palladin, A.V. und Vertaimer, N.: Dokl. Acad. Nauk. USSR 1o2,319 (1955)

1o Gaitonde, M.K. und Richter, D.: Proc. Roy. Soc. B., 145,83 (1956)

11 Lajtha, A., Berl, S. und Waelsch, H.: J. Neurochem. 3, 358 (1959)

12 Lajtha, A., S. Fürst, A. Gerstein und Waelsch, H.: J. Neurochem. 1,289 (1957)

13 siehe 12

14 Fürst, S., Lajtha, A. u. Waelsch, H.: J. Neurochem. 2, 216 (1958)

15 siehe 7

16 Maurer, W.: Dynamik des Eiweißes, S. 24
lo. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie am 9./12. April 1959 in Mosbach/Baden

17 a Neubert, D., Schaefer, J. und Kewitz, H.: Naturwissenschaften 1958, Heft 12, 29o 45. Jhg.

b Kewitz, H.: Kli. Wo. 35, 521-526 (1957)

c Kewitz, H. und Neuhoff V.: 2. Frühjahrstag. d. Pharmak. Mainz 1961 April

18 a Frawley, J.P., Hagan, E.C. und Fitzhugh, O.G.: J. Pharmacol. ex. Ther. 1o5,156 (1952)

b Davison, A.N.: Biochem. J. 6o, 339 (1955)

c Kewitz, H. u. Nachmansohn, D.: Arch. Biochem. Biophys. 66,271 (1957

19 a Wilson, J.B. und Ginsburg, S.: Arch. of Biochem. a. Biophys. 54,569 (1955)

b Wilson, J.B. und Ginsburg, S.: Biochem. et Biophysica Acta 18,168 (1955)

c Wilson, J.B. und Meislich E.K.: J. Amer. Chem. Soc. 75,4628 (1953)

d Kewitz, H. and Wilson, J.B.: Arch. of Biochem. a. Biophys. 6o,261 (1956)

e Kewitz, H., Wilson, J.B. und Nachmansohn, D.: Arch. of Biochem. a. Biophys. 64,456 (1956)

f Kewitz, H., Wilson, J.B.: Biophys. 66,263 (1957)

2o Schrader, G.: Angew. Chemie 69,86 (1957)

21 Jansz, H.S., Brons, D. und Warringa M.G.P.J.: Chemical nature of the DFP-binding site of pseudocholinesterase. Biochem. Biophys. Acta 34,573 (1959)

22 Berends, F., Posthumus, C.H., Sluys J.v.d. and Deierkauf,F.A.: The chemical basis of the "ageing process" of DFP-inhibited pseudocholinesterase. Biochem. Biophys. Acta 34,576 (1959)

23 Nachmansohn, D. and Feld,E.A.: J. Biol. Chem. 171,715 (1947)

24 Jersen-Holm, J.: Acta pharmacol. et toxicol. 17,255-266 (196o)

25 Rosenthal, S.M. and Tabor C.W.: J. Pharmacol. exp. Ther. 116, No 2, 131-138 (1956)

26 Ammon, R.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 233,486 (1934)

27 Augustinsson, K.B.: Cholinesterases, Stockholm 38 (1948)

28 Nachmansohn, D.: J. Physiol., London 93,2 P (1938)

29 Nachmansohn, D.: Bull. Soc. Chim. Biol. 21,761 (1939)

3o Bayliss, B.J. and Todrick, A.: Biochem. J. 54 XXIX(1953)

31 siehe 16

32 Herken, H. und Neubert, D.: Arch. exp. Path. Pharmakol. 219,223-233 (1953)

33 Prudden, J.F. et. al.: J. Labor. Clin. Med. 47 (1956) 37o

34 Greenbaum, A.L. und Mc Lean.: Biochem. J. 54 (1953) 4o7,413

35 Hechter, O.: J. Am. Chem. Soc. 71,3261 (1949)

36 Mann, P.J.G., Tennenbaum, M., Quastel J.H.: Biochem. J. 33,822,1506 (1939)

37 Feldberg, W.: Arch. exp. Path. Pharm. 212,64 (1950)

38 siehe 32

39 Stephenson, M. u. Yudkin, J.: Biochem. J. 30,506 (1936)

40 Gale, E.F.: Bact. Rev. 7,139 (1943)

41 Brodie, B.B., Gillette, J.R. and La Du B.N.: Ann. Rev. Biochem. 27,427 (1958)

42 Brodie, B.B., Maickel, R.P. and Jondorf, W.R.: Fed. Proc. 17,1163, (1958)

43 Neubert, D. und Herken, H.: Arch. exp. Path. Pharmak. 225,453 (1955)

44 Cook, L., Toner, J.J. and Fellows E.J.: J. Pharmacol. exp. Ther. 111,131 (1954)

45 Borsook, H., Deasy, C.L., Haagen-sunt, A.J., Keighley, G. und Lowij, P.H.: J. Biol. Chem. 187,839 (1950)

46 Zamecnik, P.C. and Keller E.B.: J. Biol. Chem. 209,337 (1954)

47 Neubert, D. und Timmler, R.: Arch. exp. Path. Pharmak. 238,358-363 (1960)

48 Vladimirov, G.: (1955) IX Sessija Acad. Med. Nauk, Moskva 58.

49 siehe 10

50 Wagle, S.R., Mehta, B., Johnson, B.C.: J. Am. Chem. Soc. 79,4249 (1957)

51 Wagle, S.R., Mehta, B., Johnson, B.C.: Arch. Biochem. Biophys. 72,241 (1957)

52 Monod, J.: Angew. Chemie, 685 (1959)

53 Coper, H., Herken, H., Koransky, W.: Arch. exp. Path. Pharm. 234,455-473 (1958)

54 siehe 47

55 Knox, E.: Ciba Foundation, Symposion on Enzymes and Drug action, J.A. Churchill Ltd. London 1962

56 Lin, E.C.C. u. Knox, E.: J. Biol. Chem. 233, 1186 (1958)

57 Kenney, F.T.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 333 (1960)

58 Koelle, W. A. and Koelle G. B.: J. Pharmacol. exp. Ther. 126, 8148 (1959)

Mc Isaac R. I. and Koelle G.B.: J. Pharmacol. exp. Ther. 126, 8149 (1959)

Herrn Prof. Dr. H. Herken danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und für die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Kewitz bin ich für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 13. Juni 1931 wurde ich, Arno, Erhard Brunnemann, als Sohn des Diplomlandwirts Dr. agr. Ewald Brunnemann in Celle geboren. Von 1937 bis 1941 besuchte ich die Grundschule in Putbus/Rügen und danach bis 1945 die Oberschule am gleichen Ort. Anschließend setzte ich meine Schulausbildung an der Ernst Moritz Arndt Oberschule in Bergen/Rügen bis zum Abitur am 24. Juni 195o fort.

Am 1. April 1951 begann ich in der Löwen-Apotheke in Waren/Müritz meine zweijährige Lehrzeit als Apothekerpraktikant, die ich nach anderthalb Jahren in der St. Johannes-Apotheke in Hannover fortsetzte, wo ich am 18. März 1953 die pharmazeutische Vorprüfung bestand.

Ab November 1953 studierte ich Pharmazie an der Technischen Universität in Berlin-Charlottenburg. Nach dem zweiten Semester ließ ich mich an der Freien Universität in Berlin-Dahlem immatrikulieren, an der ich im November 1956 das pharmazeutische Staatsexamen ablegte.

Anschließend war ich ein Jahr lang als Kandidat der Pharmazie bis zu meiner Approbation in der Uhland-Apotheke in Berlin-Charlottenburg tätig.

1958 begann ich mit der Anfertigung einer Doktorarbeit am Pharmakologischen Institut der Freien Universität, Leitung Prof. Dr. med. H. Herken.